

図 6 結膜炎主要分離菌での菌別の起炎菌・推定起炎菌の割合.

■：起炎菌，■：推定起炎菌，□：非起炎菌.

結膜炎で分離された特定菌と 3 大常在菌の起炎菌・推定起炎菌の判定結果である。緑膿菌，淋菌は今回のスタディでは分離されていない。

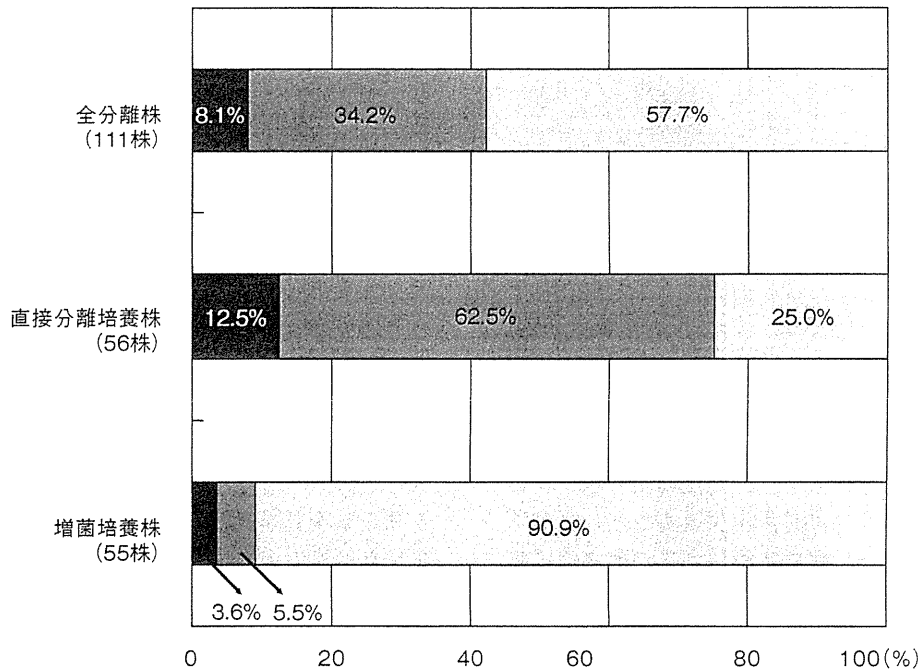


図 7 全角膜炎分離株での起炎菌・推定起炎菌の割合.

■：起炎菌，■：推定起炎菌，□：非起炎菌.

42.3% が起炎菌あるいは推定起炎菌と判定された。

14 株中起炎菌と判定された株はなく、4 株(28.6%)が推定起炎菌と判定され、アクネ菌は 43 株中 1 株(2.3%)が起炎菌、14 株(32.6%)が推定起炎菌と判定された、コリネバクテリウムは 9 株中、1 株(11.1%)が起炎菌、6

株(66.7%)が推定起炎菌と判定された。

#### IV 考 按

緒言でも述べたように、三井ら<sup>16)</sup>は汎用性抗生物質な

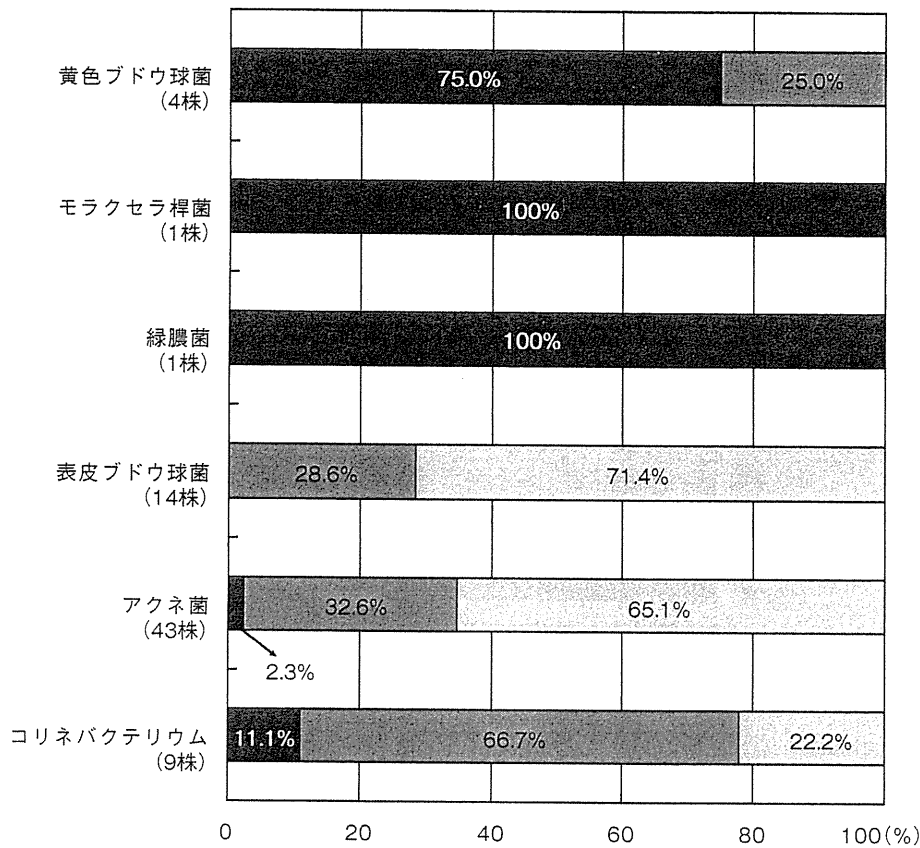


図 8 角膜炎主要分離菌での菌別の起炎菌・推定起炎菌の割合。

■：起炎菌，▨：推定起炎菌，□：非起炎菌。

角膜炎で分離された特定菌と 3 大常在菌の起炎菌・推定起炎菌の判定結果である。インフルエンザ菌，肺炎球菌，淋菌は今回のスタディでは分離されていない。

ど点眼薬の臨床試験を想定して、起炎菌とその消失についての評価基準を定めており、「1 症例から 2 種類以上の菌が分離された場合には、そのすべてが起炎菌またはその協力菌であると推定し、菌の消失とはそれらすべての菌が消失した場合と定義する。ただし、H. aegyptius 菌、インフルエンザ菌、Moraxella 菌、緑膿菌、肺炎球菌、S. aureus 菌および淋菌(以上を特定菌と呼ぶ)が検出された結膜炎など(以上を特定疾患と呼ぶ)は、臨床症状および他の分離菌を参照として、上記の菌のみを起炎菌と推定しその消失をもって菌の消失とみなすことができる」としている。この見解に基づいて我が国での抗菌点眼薬の治験は行われてきた。ここでは分離された菌を広く起炎菌として取り扱うようになっており、多くの常在菌は、同時に特定菌が分離されていない限り、そのまま起炎菌と認定される形となっている。今回のスタディでは、菌を単に分離するだけでなく、あわせてその定量も行い、また同時に塗抹検鏡の結果も勘案して起炎菌の判定を試みた。

当初、菌の貪食像を認めたものを起炎菌とするべきとの考えもあったが、貪食像をみたものは全体のサンプルの 11.5% にとどまったため、多核白血球の有無を指標とした。また、塗抹検鏡について菌と多核白血球のグレー

ド分けも行ったが、判定基準自体が想定以上に複雑なものとなった(表 2)ため、これを盛り込むことはできなかった。また、同様の理由から、治療薬に対する反応を起炎性の判定の指標として取り入れることもできなかった。したがって抗菌薬の投与によって本来の起炎菌が死滅し、代わりに増殖した非起炎菌を起炎菌と判定してしまっている可能性は残る。例えばコリネバクテリウムについていえば、コリネバクテリウムが分離された症例のうち 23.4% で抗菌薬が使用されているが、コリネバクテリウムを起炎菌とした症例ではこれが 28.1%、コリネバクテリウムを推定起炎菌とした症例では 26.1% となっている。あるいはコリネバクテリウムが分離された症例で抗菌薬を使用していない例では 35.9% が起炎菌、13.3% が推定起炎菌と判定されているが、抗菌薬が使用されている症例では 46.2% が起炎菌、15.4% が推定起炎菌と判定されている(データ示さず)。つまり抗菌薬が使用されているとコリネバクテリウムが起炎菌と判定されやすくなっているのである。これが単にコリネバクテリウムにフルオロキノロン系抗菌薬に対する耐性株が多い結果であると考えるか、あるいは前述したような菌交代をみてしまっているのかは不明である。このように薬剤耐性菌の多い菌種については影響が少なからずあ

たとえられるが、現在広く使用されているフルオロキノロン系点眼薬やセフメノキシム点眼薬がいずれも広い抗菌スペクトルを有しているため、それらによる違いが全体の結果には大きく影響しなかったと思われる。今回の判定基準は絶対的なものではなく、起炎菌として判断されたものの中にも本当は起炎菌でないものも含まれている可能性があり、その逆の場合もありうるが、真の起炎菌が不明なため、感度・特異度を云々することは難しい。特に今回は三井らの基準も参考に特定菌という概念を持ち込んだため、特定菌についてはすべて起炎菌もしくは推定起炎菌として扱っているが、頻度は低いながら、これらの菌が常在菌叢から分離されることには留意すべきである。

今回の参加施設はすべて、大学や総合病院を含まない一般開業医の診療所であるために、軽症例が多く、特定菌の分離率が低く、常在菌が逆に多いという結果となった。しかしながら、そのために 3 大常在菌については菌量や塗抹検鏡との一致性から起炎菌と考えられる場合が少なからずあり、特にコリネバクテリウムが起炎菌と判定される症例が意外に多いことが判明した。

スタディグループにおいて 2 回にわたって行った起炎菌判定委員会において症例一覧の臨床所見と塗抹検査の結果などをみて、一定の線を引いたが、菌量の基準についての統計学的な裏付けはなく、厳密に言えば、3 大常在菌については正常者で得られた結膜の菌量を基準とする方法がより適当であったと思われる。ただ参考となるのは、日本眼感染症学会で行われた術前滅菌法スタディ<sup>17)</sup>で白内障術前患者より得られた 3 大常在菌の量を示すデータである。菌の定量も阪大微生物病研究会臨床検査部において、今回とまったく同じ方法で行われており、施設、年齢はマッチしていないが、今回のデータとの比較がある程度可能と考えられる。この術前滅菌法のデータに、今回の起炎性の基準値を仮に当てはめてみると、コリネバクテリウムでは 55 株中 2 株(3.6%)、表皮ブドウ球菌では 215 株中 17 株(7.9%)、アクネ菌では 225 株中 3 株(1.3%)が「起炎性あり」と判定されるが、その割合はそれほど高くない。一方で、特にコリネバクテリウムでは、白内障術前患者と眼感染症患者では明らかに菌量に違いがあり、白内障術前患者では決して認められなかった 4,000 cfu/ml 以上の菌量を示した症例が今回多く認められたことから、その起炎性をより強く示唆しているといえる。

コリネバクテリウムについては、ジフテリア菌の他に、*C. jeikeium* が 1970 年代より敗血症の起炎菌として報告されて以来、薬剤耐性の病院感染起炎菌として注目されているが、その他の種については非病原菌とされており、眼科領域以外ではまったく無視に近い扱いとなっている。そのため、コリネバクテリウムが分離された場合、たとえ眼科由来検体であっても細菌検査室や検査セ

ンターでは雑菌として取り扱われ、眼科医側には「分離菌なし」で報告されることさえあるほどである。しかし、「起炎菌とはなりにくい」という感染性角膜炎診療ガイドラインの記載<sup>18)</sup>に反して、角膜炎の起炎菌としての報告が増加している他<sup>19)~23)</sup>、今回の起炎菌判定の結果でも、結膜炎において非常に高い菌量でコリネバクテリウムが検出される場合があり、塗抹検鏡でも 3+ となるもの、貪食像を認める症例も多い点で、従来考えられているよりも眼表面で起炎菌として働いているのではないかと考えられた。一方でコリネバクテリウムは *gyr A* 遺伝子はあるが *par C* 遺伝子はないために、*gyr A* 遺伝子の quinolone resistance-determining region(QRDR)の変異のみで容易に薬剤耐性になることが知られており、フルオロキノロン耐性が高率に生じていることが報告されている。Eguchi ら<sup>24)</sup>は、結膜から分離された *C. marginleyi* 16 株を解析し、1 株でノルフロキサシン高度耐性で *gyr A* 遺伝子 83 番の mutation を認め、15 株でノルフロキサシン・シプロフロキサシン・レボフロキサシンに高度耐性で *gyr A* 遺伝子 83 番・87 番の double mutation を認めたとしている。コリネバクテリウムが病原菌として働くケースが多いのであれば、その耐性化は大きな問題となる。

一方、表皮ブドウ球菌は、常在菌ながら、眼内炎や角膜炎の起炎菌として注目されており、結膜炎でもコリネバクテリウムよりも重要と考えられていたと思われる。しかし、今回のスタディではその起炎菌・推定起炎菌としての判定率は低かった。これは表皮ブドウ球菌が結膜においては、炎症を引き起こすうえで、あまり重要な役割を果たしていないことを示唆していると思われる。細菌は一般に bacteriocin という抗菌物質を産生することが知られており、この bacteriocin は特に自分の近縁種をよく抑えるとされる。特に表皮ブドウ球菌は Pep 5, epidermin, epilancin K 7, epicidin 280 など多くの bacteriocin を産生し、その中でも Pep 5 と epidermin はブドウ球菌をよく抑え、また epidermin は黄色ブドウ球菌は抑えるがコアグラゼ陰性ブドウ球菌は抑えないことが報告されている<sup>25)</sup>。結膜囊では表皮ブドウ球菌がコロニーを形成することによって黄色ブドウ球菌の増殖を抑制していると考えられ、現に、アトピー性皮膚炎患者ではこのバランスがくずれ、結膜囊から表皮ブドウ球菌は分離されず、黄色ブドウ球菌が分離されることが多い<sup>26)</sup>。このように表皮ブドウ球菌は結膜においては、病原菌による感染をむしろ抑制する側に回っている可能性も考えられる。

今回、結膜炎と比較して、角膜炎における「起炎菌」の判定率は低い結果となった。これは、角膜炎の場合、結膜に比較して分離培養や塗抹標本で得られるサンプルが少なく、病巣からの細菌の分離率も一般的に低いことに起因している<sup>27)</sup>。また、検体を 2 つ採取する方法が両

方の検体量を減らす結果となったうらみもある。そのため、今回のような感度の良い方法を用いても得られる菌量はやはり低いため、多核白血球の有無は問わずに、直接分離培養にて分離された菌はすべて「推定起炎菌」とした他、増菌培養にて分離された *Serratia marcescens* なども「推定起炎菌」とした。このように、結膜炎よりも基準を緩和した結果として、起炎菌・推定起炎菌両者を合わせた割合は、逆に、結膜炎よりも高くなったものと考えられる。

今回のスタディを通じて、起炎菌を一括して判定することが困難であることが逆に示された形となった。特に検体量の多寡が起炎菌判定に少なからず影響する。今回の判定基準は一つの試みであり、方法が異なれば結果も自ずと変わってくることから、今回の基準を各施設で行われている菌の分離結果にそのままあてはめることはもちろんできないが、もともとなった基本原則は応用可能ではないかと思われる。実際の臨床においては、いろいろな条件が重なる中で起炎性が発揮されるため、個々の症例においてそれぞれの細菌の起炎性を独立して考えていく必要がある。

#### 眼感染症薬剤感受性スタディグループ

安里良盛(医療法人水晶会安里眼科), 阿部 徹(阿部眼科), 生駒尚秀(いこま眼科医院), 井上 康(医療法人眼科康誠会井上眼科), 井上幸次(鳥取大学医学部視覚病態学), 魚谷 純(魚谷眼科医院), 江口秀一郎(江口眼科病院), 大橋 勉(医療法人社団大橋眼科), 大橋秀行(大橋眼科), 大橋裕一(愛媛大学医学部眼科), 岡本茂樹(医療法人幸友会岡本眼科クリニック), 岡本 豊(一般財団法人阪大微生物病研究会臨床検査部), 木村 亘(医療法人社団ひかり会木村眼科内科病院), 坂本雅子(一般財団法人阪大微生物病研究会臨床検査部), 佐々木香(出田眼科病院), 庄司 純(庄司眼科医院), 中川 尚(医療法人社団馨風会徳島診療所), 秦野 寛(ルミネはたの眼科), 稗田 牧(バプテスト眼科クリニック), 松本治恵(松本眼科), 宮田和典(医療法人明和会宮田眼科病院), 安間哲史(安間眼科)

利益相反: 井上幸次(カテゴリー F: 参天製薬), 大橋裕一(カテゴリー F: 参天製薬), 下村嘉一(カテゴリー F: 参天製薬), 眼感染症薬剤感受性スタディグループ(カテゴリー F: 日本アルコン)

#### 文 献

1) Goldstein MH, Kowalski RP, Gordon YJ : Emerging fluoroquinolone resistance in bacterial keratitis A 5-year review. *Ophthalmology* 106 : 1313—1318, 1999.

- 2) Kowalski RP, Yates KA, Romanowski EG, Karenchak LM, Mah FS, Gordon YJ : An Ophthalmologist's guide to understanding antibiotic susceptibility and minimum inhibitory concentration data. *Ophthalmology* 112 : 1987—1991, 2005.
- 3) Oliveira AD, D'Azevedo PA, Francisco W : *In vitro* activity of fluoroquinolones against ocular bacterial isolates in Sao Paulo, Brazil. *Cornea* 26 : 194—198, 2007.
- 4) Asbell PA, Colby KA, Deng S, McDonnell P, Meisler DM, Raizman MB, et al : Ocular TRUST : Nationwide antimicrobial susceptibility patterns in ocular isolates. *Am J Ophthalmol* 145 : 951—958, 2008.
- 5) Sueke H, Kaye S, Neal T, Murphy C, Hall A, Whittaker D, et al : Minimum inhibitory concentrations of standard and novel antimicrobials for isolates from bacterial keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51 : 2519—2524, 2010.
- 6) 宮尾益也, 本山まり子, 阿部達也, 笹川智幸, 大石正夫 : 新潟大学眼感染症クリニックにおける検出菌と薬剤感受性検査の成績(1982—1991年). *眼紀* 44 : 1577—1583, 1993.
- 7) 浅野浩一, 村山禎一郎, 北川和子, 佐々木一之, 早瀬 満 : 外眼部感染症分離菌とその薬剤感受性(1989年—1993年). *眼科* 41 : 1035—1042, 1999.
- 8) 青山繁樹, 下田幸紀, 北川和子, 佐々木一之 : 外眼部感染症分離菌とその薬剤感受性(1994年—1996年). *眼科* 41 : 1149—1155, 1999.
- 9) 秋葉真理子, 秋葉 純 : 乳幼児細菌性の検出菌と薬剤感受性の検討. *あたらしい眼科* 18 : 929—931, 2001.
- 10) 原 二郎, 横山順子, 田聖 花, 清水一弘, 池田恒彦 : 外眼部感染症からの臨床分離菌の薬剤感受性. *あたらしい眼科* 18 : 89—93, 2001.
- 11) 藤 紀彦, 田原昭彦 : 眼脂培養による細菌の薬剤感受性. *臨眼* 57 : 439—443, 2003.
- 12) 砂田淳子, 上田安希子, 井上幸次, 大橋裕一, 宇野敏彦, 北川和子, 他 : 感染性角膜炎全国サーベイランス分離菌における薬剤感受性と市販点眼薬の postantibiotic effect の比較. *日眼会誌* 110 : 973—983, 2006.
- 13) 松本治恵, 井上幸次, 大橋裕一, 臼井正彦, COI 細菌性結膜炎検出菌スタディグループ : 多施設共同による細菌性結膜炎における検出菌動向調査. *あたらしい眼科* 24 : 647—654, 2007.
- 14) 堀由紀子, 望月清文, 村瀬寛紀, 末松寛之, 山岸由香, 三鴨廣繁 : 外眼部感染症における検出菌とその薬剤感受性に関する検討(1998年—2006年). *日眼会誌* 113 : 583—595, 2009.
- 15) Japanese Respiratory Society : Diagnosis of hospital-acquired pneumonia and methods of testing for pathogens. *Respirology* 14 : S 10—22, 2009.
- 16) 三井幸彦, 北野周作, 内田幸男, 田中直彦, 小林俊作, 徳田久弥, 他 : 細菌性外眼部感染症に対する汎用抗生物質等点眼薬の評価基準, 1985 : *日眼会誌* 90, 511—515, 1986.

- 17) Inoue Y, Usui M, Ohashi Y, Shiota H, Yamazaki T for the Preoperative Disinfection Study Group : Preoperative disinfection of the conjunctival sac with antibiotics and iodine compounds : A prospective randomized multicenter study. *Jpn J Ophthalmol* 52 : 151—161, 2008.
- 18) 井上幸次, 大橋裕一, 浅利誠志, 石橋康久, 宇野敏彦, 木下 茂, 他 : 感染性角膜炎診療ガイドライン. *日眼会誌* 111 : 769—809, 2007.
- 19) Funke G, Pagano-Niederer M, Bernauer W : *Corynebacterium macginleyi* has to date been isolated exclusively from conjunctival swabs. *J Clin Microbiol* 36 : 3670—3673, 1998.
- 20) Jousseaume AM, Funke G, Jousseaume F : *Corynebacterium macginleyi* : a conjunctiva specific pathogen. *Br J Ophthalmol* 84 : 1420—1422, 2000.
- 21) 柿丸晶子, 川口亜佐子, 三原悦子, 宮崎 大, 井上幸次 : レボフロキサシン耐性コリネバクテリウム融合糸感染の 1 例. *あたらしい眼科* 21 : 801—804, 2004.
- 22) Suzuki T, Iihara H, Uno T, Hara Y, Ohkusu K, Hata H, et al : Suture-related keratitis caused by *Corynebacterium macginleyi*. *J Clin Microbiol* 45 : 3833—3836, 2007.
- 23) 稲田耕大, 前田郁世, 池田欣史, 宮崎 大, 井上幸次, 江口 洋, 他 : コリネバクテリウムが起炎菌と考えられた感染性角膜炎の 1 例. *あたらしい眼科* 26 : 1105—1107, 2009.
- 24) Eguchi H, Kuwahara T, Miyamoto T, Nakayama-Imaohji H, Ichimura M, Hayashi T, et al : High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J Clin Microbiol* 46 : 527—532, 2008.
- 25) Nascimento JS, Ceotto H, Nascimento SB, Giambiagi-Demarval M, Santos KR, Bastos MC : Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant staphylococcal strains. *Lett Appl Microbiol* 42 : 215—221, 2006.
- 26) Nakata K, Inoue Y, Harada J, Maeda N, Watanabe H, Tano Y, et al : A high incidence of *Staphylococcus aureus* colonization in the external eyes of patients with atopic dermatitis. *Ophthalmology* 107 : 2167—2171, 2000.
- 27) 感染性角膜炎全国サーベイランス・スタディグループ : 感染性角膜炎全国サーベイランス—分離菌・患者背景・治療の現況—. *日眼会誌* 110 : 961—972, 2006.

## 前眼部・外眼部感染症起炎菌の薬剤感受性

—日本眼感染症学会による眼感染症起炎菌・薬剤感受性多施設調査(第二報)—

秦野 寛<sup>1)</sup>, 井上 幸次<sup>2)</sup>, 大橋 裕一<sup>3)</sup>, 下村 嘉一<sup>4)</sup>, 坂本 雅子<sup>5)</sup>  
岡本 豊<sup>5)</sup>; 眼感染症薬剤感受性スタディグループ<sup>1)</sup>ルミネはたの眼科, <sup>2)</sup>鳥取大学医学部視覚病態学, <sup>3)</sup>愛媛大学医学部視機能外科学<sup>4)</sup>近畿大学医学部眼科学, <sup>5)</sup>一般財団法人阪大微生物病研究会臨床検査部

## 要 約

**目的:** 前眼部・外眼部感染症からの起炎菌について, その薬剤感受性調査を2007年9月から2008年8月の間に, 全国規模で実施した。

**対象と方法:** 別報の起炎菌・推定起炎菌判定基準により選定した起炎菌について, 現在日本で使用されている主要抗菌点眼薬(6系統10種類)について最小発育阻止濃度(minimum inhibitory concentration)を測定して, 薬剤感受性の現状分析を行った。

**結果:** 起炎菌全281株全体としてセフメノキシム(CMX)が最も高度感受性で, 次いでフルオロキノロン系薬剤であった。さらに, 各主要菌種別に同様の感受性分析を行った。ブドウ球菌属, レンサ球菌属には概ねフ

ルオロキノロン系薬剤が高度感受性で, インフルエンザ菌にはフルオロキノロン系が例外なく高度感受性であった。コリネバクテリウムにはCMXが, アクネ菌にはエリスロマイシンがそれぞれ高度感受性であった。

**結論:** 前眼部・外眼部感染症起炎菌に対してCMX, フルオロキノロン系薬剤は全般的に良好な感受性を有している。(日眼会誌115:814-824, 2011)

**キーワード:** 前眼部・外眼部感染症, 抗菌薬, 薬剤感受性, 最小発育阻止濃度(MIC), フルオロキノロン系薬剤

Drug Sensitivity of Causative Agents in Ocular Infection  
of External Adnexa and Anterior Segments—Multicenter Study of Causative Agents and Drug Sensitivity of Ocular Infection  
by the Japanese Association for Ocular Infection Part IIHiroshi Hatano<sup>1)</sup>, Yoshitsugu Inoue<sup>2)</sup>, Yuichi Ohashi<sup>3)</sup>, Yoshikazu Shimomura<sup>4)</sup>, Masako Sakamoto<sup>5)</sup>  
and Yutaka Okamoto<sup>5)</sup>; Drug Sensitivity for Ocular Infection Study Group<sup>1)</sup>Hatano Eye Clinic<sup>2)</sup>Division of Ophthalmology and Visual Science, Faculty of Medicine, Tottori University<sup>3)</sup>Department of Ophthalmology, Ehime University School of Medicine<sup>4)</sup>Department of Ophthalmology, Kinki University Faculty of Medicine<sup>5)</sup>Laboratory Diagnostic Service Section, The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University

## Abstract

**Purpose:** To report the drug sensitivity of causative agents produced by ocular infection of external adnexa and anterior segments investigated by the nationwide survey conducted by Japanese Association for Ocular Infection between September, 2007 and August, 2008.

**Subjects and Methods:** Among all strains isolated, causative and presumed causative agents were selected according to the criteria described, and drug sensitivity tests were conducted by minimum inhibitory concentrations(MIC) with 10 kinds of antimicrobial agents including 5 fluoroquinolones.

**Results:** Among 281 causative isolates, cefmenoxime(CMX) showed the highest sensitivity, followed by fluoroquinolones. Staphylococci and Streptococci

were more sensitive to fluoroquinolones when compared to the others. *Haemophilus influenzae* was very sensitive to all fluoroquinolones. *Corynebacterium* spp. and *Propionibacterium acnes* were most sensitive to CMX and erythromycin respectively.

**Conclusion:** CMX and fluoroquinolones showed generally good sensitivity among causative pathogens of ocular infection.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 115:814-824, 2011)

**Key words:** External eye infections, Antimicrobial agents, Drug sensitivity, Minimum inhibitory concentration(MIC), Fluoroquinolones

別刷請求先: 251-0052 藤沢市藤沢438-1 JR藤沢駅ビル・ルミネ7F ルミネはたの眼科 秦野 寛

(平成22年10月7日受付, 平成23年3月15日改訂受理) E-mail: hrsh@ha-ta-no.jp

Reprint requests to: Hiroshi Hatano, M.D. Hatano Eye Clinic, 438-1 Fujisawa, Fujisawa-shi, Kanagawa-ken 251-0052, Japan

(Received October 7, 2010 and accepted in revised form March 15, 2011)

## I 緒 言

近年、強い抗菌力と広い抗菌スペクトルを持つ抗菌薬が開発されてきた一方で、こうした抗菌薬に対する耐性菌の増加が報告されている。1961年に英国で初報告後、日本では1980年代に初めて報告されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA)<sup>1)</sup>に対してバンコマイシン(VCM)が広く使用されているが、最近ではVCM耐性の vancomycin-resistant *S. aureus*(VISA)の出現も報告されている。さらに肺炎球菌<sup>2)</sup>やインフルエンザ菌<sup>3)</sup>などの新たな耐性菌の出現も報告されており、これらによる感染症の難治化が懸念されていることは周知の事実である。眼科領域でもMRSAなどの耐性菌による結膜炎<sup>4)</sup>をはじめとして、涙嚢炎、角膜炎、眼内炎<sup>5)</sup>などが報告されている。

耐性菌感染症をコントロールするには薬剤感受性の最新情報が不可欠である。そのためには定期的な眼疾患別の起炎菌とその薬剤感受性の把握を行い、抗菌薬の適正使用を図る必要がある。

我々は現在我が国で主に商品として入手できる抗菌点眼薬の適正使用の指標を得るため、全国多施設研究を実施した。分離検出された菌についてその感受性をみるのが一般的に行われているが、本来臨床的に重要なのは、検出菌ではなく、起炎菌である。そこで今回は前眼部・外眼部感染症からの検出菌を分析し、起炎菌判定基準を用いて判定した起炎菌株について薬剤感受性を検討したので報告する。なお、起炎菌判定については本研究第一報にて詳細に記述されている。

## II 実験方法

対象は、全国18の試験参加施設において、2007年9月22日から2008年8月25日の間に、前眼部・外眼部感染症疑いで受診した患者(抗菌薬の投与症例を含む)である。症例は478例(男性191人、女性287人)、平均年齢は59歳(0歳~97歳)である。疾患別では結膜炎306例、角膜炎86例、麦粒腫・化膿性霰粒腫(眼瞼炎を含む)41例、涙嚢炎(涙小管炎を含む)43例であった。2例は後眼部の感染であったため対象から除外した。分離された株は全部で909株あったが、真菌を除いた890株の細菌について検討した。

対象患者に本調査の説明のうえ、文書同意を取得した後、対象患者の感染部位から、綿棒による擦過により2種類の検体を採取した。1種類は塗抹検鏡用にリング付きスライドガラスに塗抹し、メチルアルコールで固定した。また、もう1種類は分離培養のため、輸送用培地(ANAポート微研<sup>®</sup>)に検体を保管し、輸送や保存期間の影響を受けないようにするために凍結保存した。2種類の検体を一般財団法人阪大微生物病研究会へ輸送し、検鏡ならびに好気性・嫌気性培養を実施し、菌の分離・

同定を行った。なお、本研究については参加施設を一括して中央倫理審査を行った。

外眼部感染症の起炎菌判定基準を設け、起炎菌と判定された対象菌に対しモキシフロキサシン(MFLX)、ガチフロキサシン(GFLX)、トスフロキサシン(TFLX)、レボフロキサシン(LVFX)、ノルフロキサシン(NFLX)、ミクロノマイシン硫酸塩(MCR)、セフメノキシム塩酸塩(CMX)、エリスロマイシン(EM)、クロラムフェニコール(CP)、バンコマイシン(VCM)の10剤の最小発育阻止濃度(minimum inhibitory concentration: MIC)を測定した。

MIC測定の菌液調製は、非選択寒天培地に被検菌株を一夜培養し、滅菌生理食塩水でMcFarland 1に懸濁して行った。さらに、滅菌生理食塩水で10倍希釈し、接種用菌液とした。測定は微量液体希釈法で行った。薬剤含有 Muller Hinton 培地の入った96穴プレートの各ウェルに接種用菌液0.0025 ml接種し、これにより最終接種菌量は $5 \times 10^4$  cfu(colony forming unit)/ウェルになった。プレートは $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 、16~24時間培養したが、培地、培養条件は菌種により異なった。判定は、薬剤を含まない対照ウェルの菌発育を確認したうえで、菌の発育を認めない最小濃度のウェルの薬剤濃度をMICと判定した。

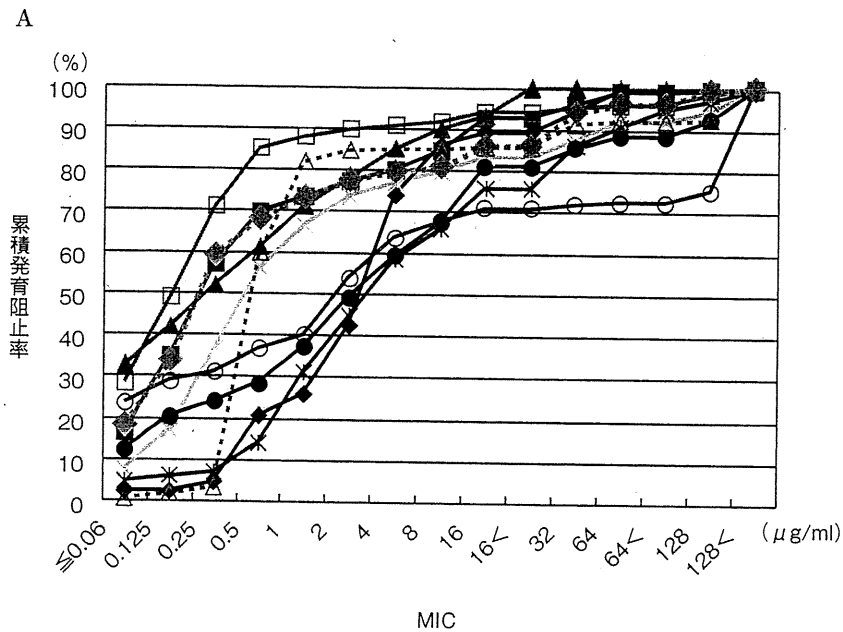
MICの結果は累積発育阻止率曲線としてまとめ、MIC<sub>80</sub>、MIC<sub>90</sub>を求めて、薬剤間の差異を検討した。

## III 結 果

今回対象となった476例の前眼部・外眼部感染症症例から890株の菌が分離(増菌培養も含む)された。これらの分離菌に対し、第一報にて記述されたごとく、前眼部・外眼部感染症の起炎菌判定基準を設け、起炎菌ならびに推定起炎菌を判定した。全分離株890株中、起炎菌と判定された菌が167株(18.8%)、推定起炎菌と判定された菌が134株(15.1%)であった。詳しい菌種については第一報にて報告している。これら301株のうち、発育不良などにより感受性検査が適切に行えない菌を除いた281株について感受性検査を行った。

次に、今回分離された起炎菌について、薬剤感受性の結果を示す。図1~8に累積発育阻止率とMIC range、MIC<sub>80</sub>、MIC<sub>90</sub>を示しているが、本文ではすべての薬剤感受性比較はMIC<sub>90</sub>を基準に記載する。まずはじめに、起炎菌ならびに推定起炎菌と判定された全菌株(合計281株)に対する累積発育阻止率とMICを図1に示す。全菌株に対する薬剤感受性を比べるとMIC<sub>90</sub>値はCMXが4 µg/mlで最も低く、次いでTFLXの8、GFLXの16、MFLX、VCM、CPの32 µg/mlの順で感受性が高い結果であった。

次に、主要な菌種別についてみる。黄色ブドウ球菌のうち、methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*(MSSA)



B

	Range	MIC <sub>80</sub>	MIC <sub>90</sub>
MFLX	≦0.06~128	8	32
GFLX	≦0.06~128<	4	16
TFLX	≦0.06~16<	4	8
LVFX	≦0.06~128<	16	64
NFLX	≦0.06~128<	32	64
MCR	≦0.06~128<	16	128
CMX	≦0.06~128<	0.5	4
EM	≦0.06~128<	128<	128<
CP	≦0.06~128	8	32
VCM	≦0.06~128<	1	32

図 1 起炎菌 281 菌株に対する累積発育阻止率曲線(A)と MIC(B).

◆◆◆ : MFLX(モキシフロキサシン), ■ : GFLX(ガチフロキサシン), ▲ : TFLX(トスフロキサシン), ◆◆◆ : LVFX(レボフロキサシン), \* : NFLX(ノルフロキサシン), ● : MCR(マイクロノマイシン硫酸塩), □ : CMX(セフメノキシム塩酸塩), ○ : EM(エリスロマイシン), ◆◆◆ : VCM(バンコマイシン).

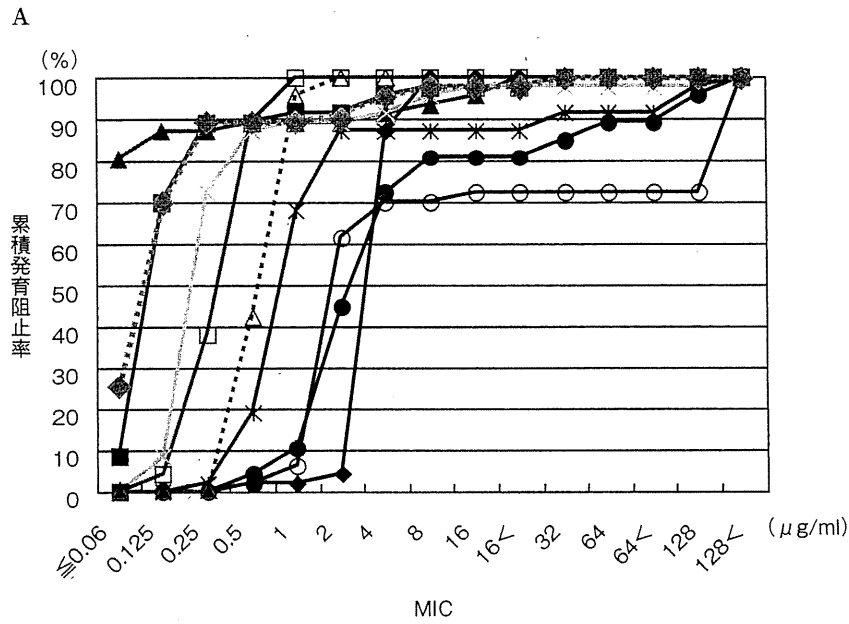
MIC : minimum inhibitory concentration.

47 株(図 2)の MIC<sub>90</sub>は CMX, VCM, GFLX が 1 µg/ml, 次いで MFLX が 2, TFLX, LVFX が 4 µg/ml の順で感受性が高い結果であった. 一方, MRSA 12 株(図 3)に対しては, フルオロキノロン系を含めて多くの薬剤の累積発育阻止率曲線が右側にシフトしており, 耐性傾向を認める中, MIC<sub>90</sub>は VCM : 2, 次いで CP : 8 µg/ml で, 他剤に比べ低い MIC 値であった. 肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*) 7 株(図 4)においては TFLX が 0.25 µg/ml で最も低く, 次いで CMX, VCM, MFLX, GFLX が 0.5 µg/ml であった. インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*) 14 株(図 5)では MFLX, GFLX, TFLX, LVFX のフルオロキノロン系の薬剤が 0.06 µg/ml 以下ときわめて低い MIC 値を示し, 対照的に

MRSA に有用な VCM はこのインフルエンザ菌では 32 µg/ml と高い MIC 値を示した.

次に, 特定菌ではなく, 一般に常在菌と称される菌種についての結果をみる. まず, 今回最も多く起炎菌と判定されたコリネバクテリウム属(*Corynebacterium spp.*) 87 株(図 6)では, CMX : 0.25, VCM : 1 µg/ml, 次いで, TFLX : 16, MFLX, GFLX : 32 µg/ml の順であった. MCR は MIC<sub>90</sub> 128 µg/ml であったが, 累積発育阻止率のカーブは左方に位置しており, MIC<sub>80</sub>は 1 µg/ml と 3 番目に低い値を示しており, 多くの株は感受性を示すと考えられた. アクネ菌(*Propionibacterium acnes*) 35 株(図 7)では MIC<sub>90</sub>は EM : 0.125 µg/ml が最も低く, 次いで CMX : 0.25 µg/ml, 次いで VCM, MFLX,





B

	Range	MIC <sub>80</sub>	MIC <sub>90</sub>
MFLX	≤0.06~32	0.25	2
GFLX	≤0.06~32	0.25	1
TFLX	≤0.06~16<	≤0.06	4
LVFX	0.125~128<	0.5	4
NFLX	0.25~128<	2	32
MCR	0.5~128<	8	128
CMX	0.125~1	0.5	1
EM	0.5~128<	128<	128<
CP	0.5~8	4	8
VCM	0.5~2	1	1

図 2 Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) 47 株に対する累積発育阻止率曲線 (A) と MIC (B).

◆◆◆◆ : MFLX (モキシフロキサシン), ■ : GFLX (ガチフロキサシン), ▲ : TFLX (トスフロキサシン), - - - : LVFX (レボフロキサシン), \* : NFLX (ノルフロキサシン), ● : MCR (マイクロマイシン硫酸塩), □ : CMX (セフメノキシム塩酸塩), ○ : EM (エリスロマイシン), ◆ : CP (クロラムフェニコール), - - △ - : VCM (バンコマイシン).

MIC : minimum inhibitory concentration.

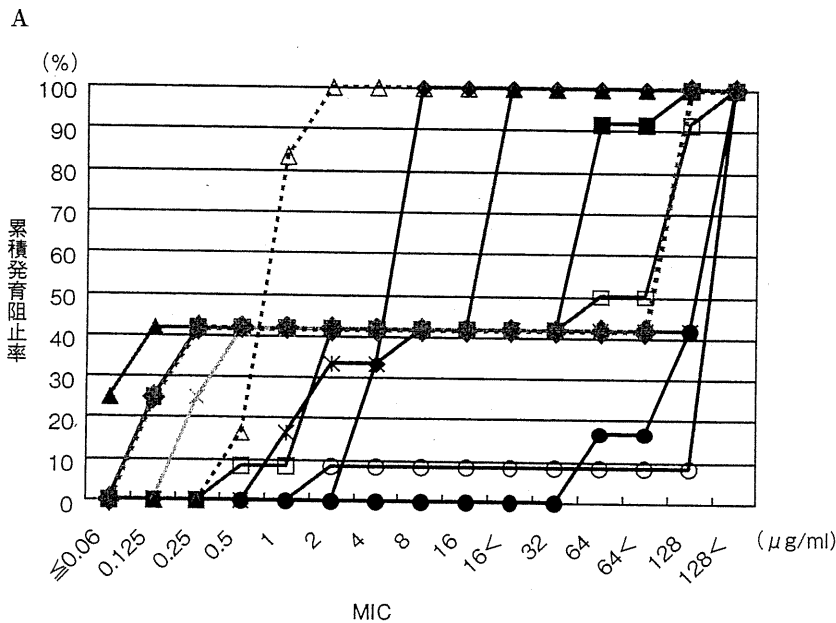
GFLX, LVFX ; 0.5 μg/ml であった。また、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 9 株 (図 8) では MFLX, GFLX が 4 μg/ml で MIC<sub>90</sub> 値が最も低く、次いで LVFX ; 8, CMX, TFLX ; 16 μg/ml であった。

#### IV 考 按

感染症への対応では効率的な治療と耐性菌の発生抑制の両面が重要である。そのための基礎資料として、病巣からの分離検出菌の中から真の起炎菌を適切に判定し、抗菌薬の適正使用を目指す必要がある。近年、感染症の対応にあたっては薬剤の有効性と安全性の両面を基礎とした最終的な有用性を評価するために、PK/PD (phar-

macokinetics/pharmacodynamics) を考慮することが重要とされている<sup>6)</sup>。医療現場でも「抗菌薬 PK/PD チェックシート」を用い、処方内容・起炎菌・MIC などを確認して処方提案などを行う取り組みが行われており、処方内容の変化や多剤耐性緑膿菌の検出頻度の減少などが報告されている<sup>7)</sup>。

今回の調査での主な検出菌は、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、肺炎球菌、アクネ菌、コリネバクテリウム、インフルエンザ菌などであった。関連文献として、前眼部・外眼部感染症から分離された検出菌の他の報告をみってみる。坂本ら<sup>8)</sup>は結膜炎を主とした 1,378 症例を対象とした細菌培養結果について報告している。その全



B

	Range	MIC <sub>80</sub>	MIC <sub>90</sub>
MFLX	0.125~128	128	128
GFLX	0.125~128	64	64
TFLX	≤0.06~16<	16<	16<
LVFX	0.125~128	128<	128<
NFLX	1~128<	128<	128<
MCR	64~128<	128<	128<
CMX	0.5~128<	128	128
EM	2~128<	128<	128<
CP	4~8	8	8
VCM	0.5~2	1	2

図3 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 12株に対する累積発育阻止率曲線(A)とMIC(B).

◆◆◆: MFLX(モキシフロキサシン), ■: GFLX(ガチフロキサシン), ▲: TFLX(トスフロキサシン), - - - : LVFX(レボフロキサシン), \* : NFLX(ノルフロキサシン), ●: MCR(マイクロノマイシン硫酸塩), □: CMX(セフメノキシム塩酸塩), ○: EM(エリスロマイシン), ◆: CP(クロラムフェニコール), -△- : VCM(バンコマイシン).

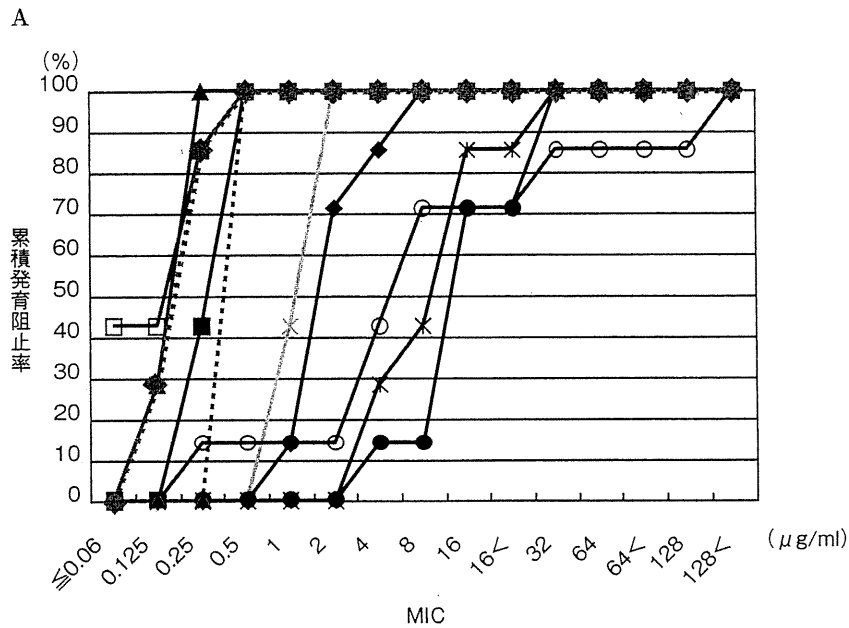
MIC: minimum inhibitory concentration.

検出菌中、最多は表皮ブドウ球菌、次いで黄色ブドウ球菌、アクネ菌であった。MRSAは全検出菌の1.4%であり、その他グラム陽性球菌は肺炎球菌、グラム陽性桿菌はコリネバクテリウムが検出された。これら検出菌はあくまで分離されたものであり、今回の我々の調査研究のように一定の判定基準によった起炎菌か否かの検証はなされていない。改めて、今回の研究の意義は、単なる検出菌ではなく、あくまでも起炎菌として判定された細菌種の薬剤感受性傾向をみた点である。

今回の調査で起炎菌と判定された全菌株に対する薬剤感受性は、検査に用いた点眼剤として利用しうる抗菌薬のうちでCMX、VCM、各種キノロン系抗菌薬の感

受性が全般に高い傾向がみられた(図1)。他方、古典的なマクロライド系のEM、アミノ配糖体系のMCR、またCPなどには低い感受性が観察された。ただしこの傾向は菌種間で株数が大幅に異なった状況での累積成績なので、それなりの見方が必要である。以下に、改めて各菌種について各系統薬剤の感受性を検討してみたい。

まず、MSSA(47株)ではフルオロキノロン系薬剤群とCMX、VCMが高い感受性を示した(図2)。黄色ブドウ球菌は外眼部感染症の主要起炎菌でありCMXは従来から第1選択治療薬として使用されることの多いセフェム系抗菌薬の一つである。今回、MSSAに対するMIC<sub>90</sub>ではCMX、VCM、GFLXが1μg/mlと最も良好であるが、



B

	Range	MIC <sub>80</sub>	MIC <sub>90</sub>
MFLX	0.125~0.5	0.25	0.5
GFLX	0.125~0.5	0.5	0.5
TFLX	0.125~0.25	0.25	0.25
LVFX	1~2	2	2
NFLX	4~32	16	32
MCR	4~32	32	32
CMX	≤0.06~0.5	0.25	0.5
EM	0.25~128<	32	128<
CP	1~8	4	8
VCM	0.5	0.5	0.5

図 4 *Streptococcus pneumoniae* 7 株に対する累積発育阻止率曲線(A)と MIC(B).

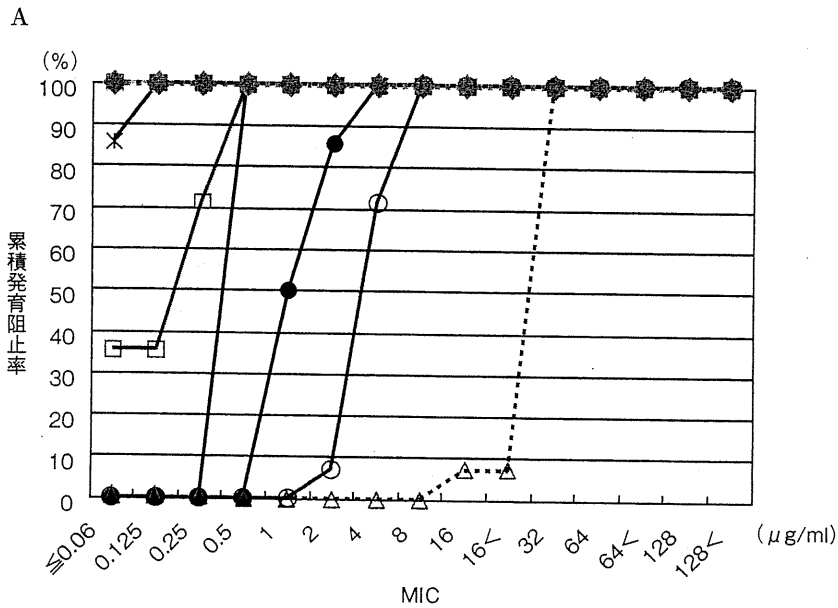
◆◆: MFLX(モキシフロキサシン), ■: GFLX(ガチフロキサシン), ▲: TFLX(トスフロキサシン), □: LVFX(レボフロキサシン), \* : NFLX(ノルフロキサシン), ●: MCR(マイクロマイシン硫酸塩), □: CMX(セフメノキシム塩酸塩), ○: EM(エリスロマイシン), ◆: CP(クロラムフェニコール), ▲: VCM(バンコマイシン).

MIC: minimum inhibitory concentration.

MIC<sub>80</sub>では TFLX 0.06 以下, MFLX, GFLX が 0.25 μg/ml の順となっている。フルオロキノロン系薬剤は優れた抗菌作用をもつ抗菌薬として汎用されているが、残念ながらブドウ球菌に対する耐性率は増加している。今回の結果では MIC<sub>90</sub>が NFLX の 32, LVFX の 4 μg/ml, MIC<sub>80</sub>が NFLX の 2, LVFX の 0.5 μg/ml と程度の差はあるが MSSA においてさえ耐性傾向が指摘できる。この 2 剤以外のフルオロキノロン系薬剤も今後の耐性化に注意は必要で、万全の薬剤でないことを念頭におく必要がある<sup>9)</sup>。

ここで MRSA の結果について考察したい。MRSA 12 株(図 3)に対しては、フルオロキノロン系薬剤を含めて多くの薬剤の累積発育阻止率曲線が右側にシフトして抵

抗性を認める中、MIC<sub>90</sub>は VCM が 2 μg/ml、次いで CP が 8 μg/ml で、他剤に比べ高い感受性を認めた。MRSA 眼感染症が報告され始めた 1989 年頃は前眼部・外眼部感染症の報告が多く、フルオロキノロン系薬剤の局所療法で治癒する例が多かった。しかし、最近では白内障術後眼内炎<sup>5)</sup>などの重篤例も報告されており、その耐性傾向は問題である。米国で眼内炎から分離された MSSA と MRSA について薬剤感受性を比べた成績<sup>10)</sup>では、ともに全株が VCM に感受性であった。MSSA では検査薬はすべて感受性であったが、MRSA では第 4 世代フルオロキノロン系薬剤である MFLX, GFLX とともに 38% 耐性であったと報告されている。MRSA に対するフルオロキノロン系薬剤の効果には限界があるとの認識



B

	Range	MIC <sub>80</sub>	MIC <sub>90</sub>
MFLX	≤0.06	≤0.06	≤0.06
GFLX	≤0.06	≤0.06	≤0.06
TFLX	≤0.06	≤0.06	≤0.06
LVFX	≤0.06	≤0.06	≤0.06
NFLX	≤0.06~0.125	≤0.06	0.125
MCR	1~4	2	4
CMX	≤0.06~0.5	0.5	0.5
EM	2~8	8	8
CP	0.5	0.5	0.5
VCM	16~32	32	32

図5 *Haemophilus influenzae* 14株に対する累積発育阻止率曲線(A)とMIC(B).

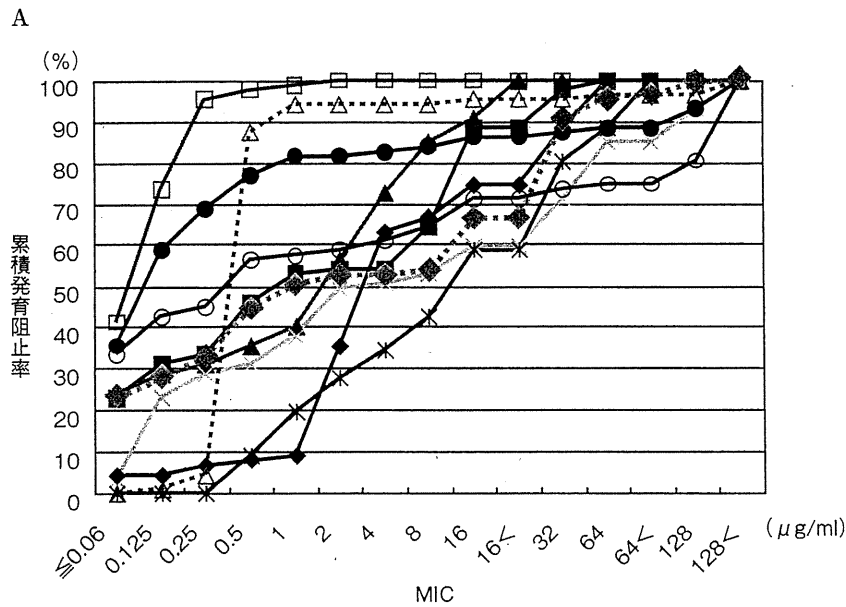
◆◆◆: MFLX(モキシフロキサシン), ■: GFLX(ガチフロキサシン), ▲: TFLX(トスフロキサシン), ◆: LVFX(レボフロキサシン), \* : NFLX(ノルフロキサシン), ●: MCR(マイクロノマイシン硫酸塩), □: CMX(セフメノキシム塩酸塩), ○: EM(エリスロマイシン), ◆: CP(クロラムフェニコール), ◆◆◆: VCM(バンコマイシン).

MIC: minimum inhibitory concentration.

は必要である。最近、特効薬であるVCMの眼軟膏が製剤化されたが、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(VRSA)も既に報告されており、その使用は慎重に考慮される必要があると考えられる。表皮ブドウ球菌(9株)ではフルオロキノロン系薬剤がMIC<sub>90</sub> 4~16 μg/mlと、薬剤間に感受性の幅がみられるものの、他の薬剤に比べれば全般に高い感受性を示したといえる。一方、1株ではあるがVCMで32 μg/mlを示したのがあり(図8)、病原性の低い表皮ブドウ球菌とはいえ、今後このような菌が増加してくる可能性もあり、この点からもVCMの眼軟膏の濫用は慎むべきであると考えられる。

肺炎球菌に対する感受性の報告では、MFLXのMIC<sub>90</sub>が0.25 μg/mlで、CMXの0.5 μg/mlとほぼ同等の活

性を示すことが示されている<sup>11)</sup>。今回の調査でも、肺炎球菌(7株)に対してフルオロキノロン系薬剤ならびにCMX、VCMが高い感受性を示しており(図4)、ほぼ同様のMIC<sub>90</sub>が得られた。フルオロキノロン系薬剤の中でみると、いわゆる第4世代フルオロキノロン系薬剤であるMFLXとGFLXはdual inhibitionから耐性化しにくいという利点があると考えられる。米国の報告<sup>12)</sup>では肺炎球菌(1,276株)の64%がペニシリン(PC)にsensitive, 17% intermediate, 19% resistantであり、約20%がPRSP(penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*)である。PC耐性株はセファロsporin系、マクロライド系、クリンダマイシン(CLDM)、テトラサイクリン(TC)、スルファメトキサゾール・トリメトプリムにも耐性傾向で



B

	Range	MIC <sub>80</sub>	MIC <sub>90</sub>
MFLX	≤0.06~128	32	32
GFLX	≤0.06~64	16	32
TFLX	≤0.06~16<	8	16
LVFX	≤0.06~128<	64	128
NFLX	0.5~64<	32	64<
MCR	≤0.06~128<	1	128
CMX	≤0.06~2	0.25	0.25
EM	≤0.06~128<	128	128<
CP	≤0.06~64	32	64
VCM	0.125~128<	0.5	1

図 6 *Corynebacterium* spp. 87 株に対する累積発育阻止率曲線(A)と MIC(B).

◆◆: MFLX(モキシフロキサシン), ■: GFLX(ガチフロキサシン), ▲: TFLX(トスフロキサシン), ◆◆◆: LVFX(レボフロキサシン), ◆◆◆◆: NFLX(ノルフロキサシン), ●: MCR(マイクロノマイシン硫酸塩), ◆◆◆◆: CMX(セフメノキシム塩酸塩), ○: EM(エリスロマイシン), ◆◆◆◆: CP(クロラムフェニコール), ◆◆◆◆: VCM(バンコマイシン).

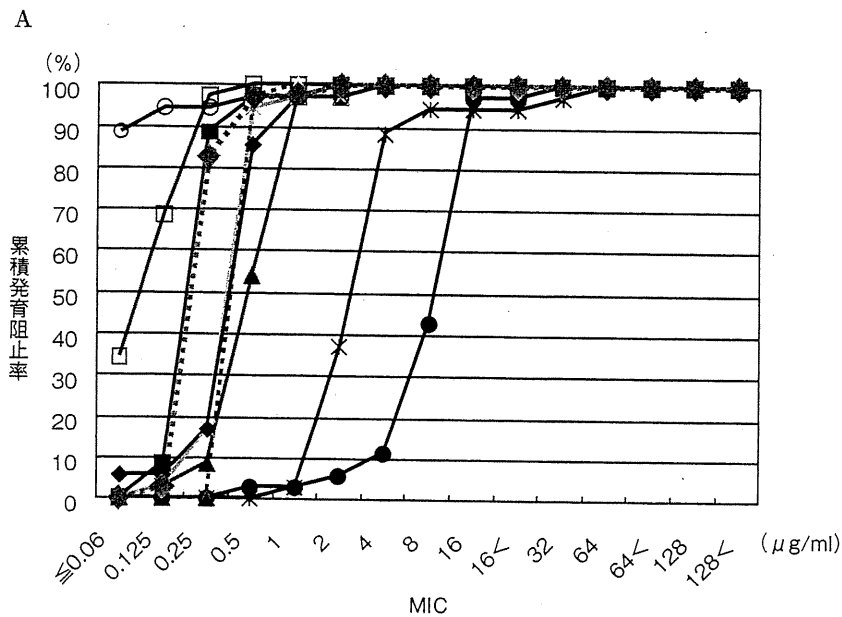
MIC: minimum inhibitory concentration.

あったが、フルオロキノロン系、VCM、リファンピシンには耐性はなかったと報告している。

インフルエンザ菌に関してはフルオロキノロン系薬剤がきわめて高い感受性を示した(図5)。これまでもフルオロキノロン系薬剤のインフルエンザ菌に対するMIC<sub>90</sub>は0.06 μg/ml以下と報告されている<sup>11)</sup>。インフルエンザ菌は近年、各種β-ラクタム系抗菌薬に対する耐性化が問題となっている<sup>3)</sup>が、フルオロキノロン系薬剤にはほとんど耐性傾向はみられていない。

アクネ菌ではEMが最も良好な感受性を示し、CMXが次であった。他方MCRは、嫌気性菌がアミノ配糖体薬に耐性であるとの原則どおり、他剤より明らかに低感受性を示した。全般にフルオロキノロン系薬剤はEM、

CMXに次ぐ良好な感受性がみられた(図7)。またSmithら<sup>13)</sup>によれば、最近のβ-ラクタム系薬剤とフルオロキノロン系薬剤などについて、眼科分離株に対する感受性を検討しているが、ともに良好な感受性であると報告している。今回調べた薬剤中ではEMが最も感受性が良好であったが、他領域ではアクネ菌に対して何が高感受性であろうか。皮膚科からの報告<sup>14)</sup>ではEM、アンピシリン、CLDM、ミノサイクリン(MINO)、ナジフロキサシン、セファレキシン、ドキシサクリン、オフロキサシン、TCについて比較した結果、EMが感受性で最も優れ、MINOが耐性化率0で優れていたとしている。したがって、アクネ菌の治療ではEMが第一選択剤としてよいと思われる。



B

	Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
MFLX	0.125~2	0.25	0.5
GFLX	0.125~2	0.25	0.5
TFLX	0.125~4	1	1
LVFX	0.125~4	0.5	0.5
NFLX	1~64	4	8
MCR	0.5~32	16	16
CMX	≤0.06~0.5	0.25	0.25
EM	≤0.06~4	≤0.06	0.125
CP	≤0.06~2	0.5	1
VCM	0.5~1	0.5	0.5

図7 *Propionibacterium acnes* 35株に対する累積発育阻止率曲線(A)とMIC(B).

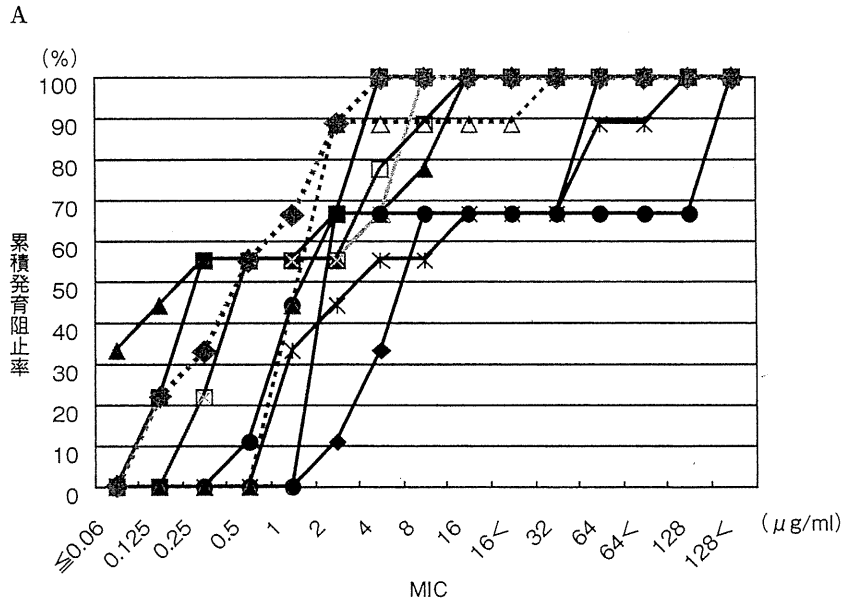
◆◆◆: MFLX(モキシフロキサシン), ■: GFLX(ガチフロキサシン), ▲: TFLX(トスフロキサシン), ◆◆◆: LVFX(レボフロキサシン), \* : NFLX(ノルフロキサシン), ●: MCR(マイクロマイシン硫酸塩), □: CMX(セフメノキシム塩酸塩), ○: EM(エリスロマイシン), ◆: CP(クロラムフェニコール), ◆◆◆: VCM(バンコマイシン).

MIC: minimum inhibitory concentration.

コリネバクテリウムは最近、角膜感染症の起炎菌となること<sup>15)16)</sup>や菌自体が結石を生じる事例<sup>17)</sup>なども報告されてきている。本菌は従来考えられてきたような単なる常在の雑菌ではなくて、今回の起炎菌判定からも起炎菌として前眼部・外眼部感染症と関係していることがさらに明らかとなった。本菌のMIC<sub>90</sub>は、CMXで0.25 µg/ml、フルオロキノロン系薬剤で16~128 µg/mlと報告されている<sup>11)</sup>が、本研究でも、CMXのMIC<sub>90</sub>が0.25 µg/mlと高い感受性が得られ、フルオロキノロン系薬剤で16~128 µg/mlと耐性傾向がみられたのは同様の傾向であった(図6)。最近、Eguchiら<sup>18)</sup>により本菌の菌種による病原性の差やキノロン耐性機構に関する分子生物学的解析の詳細が報告されている。一方、MCRも本研究

ではコリネバクテリウムに良好な感受性を示した。したがって、本菌にはセフェム系のCMXや、MCRなどのアミノ配糖体系が有力選択肢の一つとなるだろうと考えられる。

米国でのOcular Tracking Resistance in U.S. Today (TRUST)<sup>19)</sup>の2008年版では、眼科分離株 *S. aureus* 197株, *S. pneumoniae* 809株, *H. influenzae* 388株について調べたシプロフロキサシン(CFLX), GFLX, LVFX, MFLX, PC, アジスロマイシン, トブラマイシン, トリメトプリム, ポリミキシンBに対する感受性検査結果が報告されている。フルオロキノロン群では各薬剤ともMSSA, MRSAに対し同傾向で、MSSAの感受性が79.9%~81.1%, MRSAでは15.2%である。*S. pn-*



B

	Range	MIC <sub>80</sub>	MIC <sub>90</sub>
MFLX	0.125~4	2	4
GFLX	0.125~4	4	4
TFLX	≤0.06~16	16	16
LVFX	0.125~8	8	8
NFLX	1~128	64	128
MCR	0.5~128<	128<	128<
CMX	0.25~16	8	16
EM	2~128<	128<	128<
CP	2~64	64	64
VCM	1~32	2	32

図 8 *Staphylococcus epidermidis* 9 株に対する累積発育阻止率曲線(A)と MIC(B).

◆◆: MFLX(モキシフロキサシン), ■: GFLX(ガチフロキサシン), ▲: TFLX(トスフロキサシン), ◆: LVFX(レボフロキサシン), \* : NFLX(ノルフロキサシン), ●: MCR(マイクロマイシン硫酸塩), □: CMX(セフメノキシム塩酸塩), ○: EM(エリスロマイシン), ◆: CP(クロラムフェニコール), ◆: VCM(バンコマイシン).

MIC : minimum inhibitory concentration.

*eumoniae* は GFLX, LVFX, MFLX に対し 100% の株が感受性で, CFLX のみ 89.8% と低い. *H. influenzae* はトリメトプリムを唯一例外として, その他では 100% の感受性がみられている. この結果をみると, 今回の我々のデータと共通して用いた GFLX, LVFX, MFLX に関して日米比較すると MSSA, MRSA, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* とも同傾向の感受性と考えられる.

前眼部・外眼部感染症では起炎菌を同定する以前に抗菌薬の投与を開始する, いわゆる empiric therapy が一般的である. 実際の臨床では, 感染部位や年齢, あるいは季節によっても起炎菌の傾向が異なることを考慮して抗菌薬を選択しているが, 安易なパターン化した処方 を繰り返したり, 感受性の低下した薬剤を長期使用したり

することが耐性化につながる可能性があるため, 今後は抗菌薬の適正な選択とその用法, 用量を守ることがきわめて重要と考えられる.

一般論として, 抗菌力の弱い薬剤を長期投与すると耐性菌が生じやすいことから, できるだけ投与期間は必要最低限にすることが合理的である<sup>20)</sup>. また突然変異抑制濃度(mutant prevention concentration : MPC)の低い抗菌薬, つまり強い抗菌力のものが耐性化を抑えると考えられるため<sup>21)</sup>, これらを総合して抗菌薬の投与目的を益最大, 不利益最小にするためには, 短期・強力戦略(short and strong strategy)は意味あると考えられる. その前提として, 今回の第一報, 第二報調査のように, 起炎菌と薬剤感受性の最新動向を定期的に把握・分析し, 抗菌

薬の合理的使用を図ることが重要であると考えられる。

#### 眼感染症薬剤感受性スタディグループ

安里良盛(医療法人水晶会安里眼科), 阿部 徹(阿部眼科), 生駒尚秀(いこま眼科医院), 井上 康(医療法人眼科康誠会井上眼科), 井上幸次(鳥取大学医学部視覚病態学), 魚谷 純(魚谷眼科医院), 江口秀一郎(江口眼科病院), 大橋 勉(医療法人社団大橋眼科), 大橋秀行(大橋眼科), 大橋裕一(愛媛大学医学部眼科), 岡本茂樹(医療法人幸友会岡本眼科クリニック), 岡本 豊(一般財団法人阪大微生物病研究会臨床検査部), 木村 亘(医療法人社団ひかり会木村眼科内科病院), 坂本雅子(一般財団法人阪大微生物病研究会臨床検査部), 佐々木香(出田眼科病院), 庄司 純(庄司眼科医院), 中川 尚(医療法人社団馨風会徳島診療所), 秦野 寛(ルミネはたの眼科), 稗田 牧(バプテスト眼科クリニック), 松本治恵(松本眼科), 宮田和典(医療法人明和会宮田眼科病院), 安間哲史(安間眼科)

利益相反：井上幸次(カテゴリー F：参天製薬), 大橋裕一(カテゴリー F：参天製薬), 下村嘉一(カテゴリー F：参天製薬), 眼感染症薬剤感受性スタディグループ(カテゴリー F：日本アルコン)

#### 文 献

- 1) 紺野昌俊, 生方公子, 高橋洋子, 佐々木有字子, 川上小夜子: 本邦で分離されたゲンタマイシン耐性黄色ブドウ球菌について. 第1編 臨床検査材料からのゲンタマイシン耐性菌の分離頻度と薬剤感受性ならびにファージ型について. *Chemotherapy* 30: 86—95, 1982.
- 2) 小栗豊子, 三澤成毅, 猪狩 淳: 臨床材料から分離した肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)に対する経口β-ラクタム系薬の抗菌力について. *日化療会誌* 43: 531—538, 1995.
- 3) Powell M, Yeo SF, Seymour A, Yuan M, Williams JD: Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* from England and Scotland in 1991. *J Antimicrob Chemother* 29: 547—554, 1992.
- 4) 大橋秀行: 高齢者の結膜嚢内 MRSA 保菌者と MRSA 結膜炎. *あたらしい眼科* 17: 191—195, 2000.
- 5) 米良明子, 大庭啓介, 雨宮次生: 白内障術後の MRSA 眼内炎の臨床経過—治癒例と非治癒例の比較. *臨眼* 53: 1979—1984, 1999.
- 6) 森田邦彦: PK/PD からみた抗菌薬適正使用の実践. *月刊薬事* 45—51, 2004.
- 7) 小笠原康雄, 大野公一, 播野俊江, 船原弘子, 後藤千栄, 長崎浩, 他: 病棟薬剤師による「抗菌薬 PK/PD チェックシート」を活用した抗菌薬適正使用への取り組み. *環境感染誌* 123: 112—123, 2008.

- 8) 坂本雅子, 弘田和枝: 外眼部感染症 1378 症例における検出菌分布. *医学検査* 52: 247—252, 2003.
- 9) 青山繁樹, 下田幸紀, 北川和子, 佐々木一之: 外眼部分離菌とその薬剤感受性(1994 年—1996 年). *眼科* 41: 1149—1155, 1999.
- 10) Major JC Jr, Engelbert M, Flynn HW Jr, Miller D, Smiddy WE, Davis JL: *Staphylococcus aureus* endophthalmitis: antibiotic susceptibilities, methicillin resistance, and clinical outcomes. *Am J Ophthalmol* 149: 278—283, 2010.
- 11) 渡邊雅一, 石塚啓司, 池元敏雄: モキシフロキサシン点眼液(ベガモックス™点眼液 0.5%)の薬理学的特性および臨床効果. *日薬理誌* 129: 375—385, 2007.
- 12) Thornsberry C, Ogilvie PT, Holley HP Jr, Sahm DF: Survey of susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* isolates to 26 antimicrobial agents: a prospective U.S. study. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2612—2623, 1999.
- 13) Smith MA, Alperstein P, France K, Vellozzi EM, Isenberg HD: Susceptibility testing of *Propionibacterium acnes* comparing agar dilution with E test. *J Clin Microbiol* 34: 1024—1026, 1996.
- 14) Kurokawa I, Nishijima S, Kawabata S: Antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolated from acne vulgaris. *Eur J Dermatol* 9: 25—28, 1999.
- 15) 稲田耕大, 前田郁世, 池田欣史, 宮崎 大, 井上幸次, 江口 洋, 他: コリネバクテリウムが起炎菌と考えられた感染性角膜炎の 1 例. *あたらしい眼科* 26: 1105—1107, 2007.
- 16) Suzuki T, Iihara H, Uno T, Hara Y, Ohkusu K, Hata H, et al: Suture-related keratitis caused by *Corynebacterium macginleyi*. *J Clin Microbiol* 45: 3833—3836, 2007.
- 17) Mihara E, Shimizu M, Touge C, Inoue Y: Case of a large, movable bacterial concretion with biofilm formation on the ocular surface. *Cornea* 23: 513—515, 2004.
- 18) Eguchi H, Kuwahara T, Miyamoto T, Nakayama-Imahoji H, Ichimura M, Hayashi T, et al: High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J Clin Microbiol* 46: 527—532, 2008.
- 19) Asbell PA, Colby KA, Deng S, McDonnell P, Meisler DM, Raizman MB, et al: Ocular TRUST: nationwide antimicrobial susceptibility patterns in ocular isolates. *Am J Ophthalmol* 145: 951—958, 2008.
- 20) 「抗菌薬使用のガイドライン」作成委員会: I-2 抗菌薬選択の注意事項. 日本感染症学会, 日本化学療法学会(編): 抗菌薬使用のガイドライン. 協和企画, 東京, 6—9, 2005.
- 21) 戸塚恭一: 体内動態からみた抗菌薬の特徴と使い方. *診断と治療* 90: 2147—2151, 2002.



# Identification of pyrimethamine- and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Africa between 1984 and 1998: genotyping of archive blood samples

ArticleCategory	:	Research
ArticleHistory	:	Received: 27-Sep-2011; Accepted: 12-Dec-2011
ArticleCopyright	:	© 2011 Saito-Nakano et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License ( <a href="http://creativecommons.org/licenses/by/2.0">http://creativecommons.org/licenses/by/2.0</a> ), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Yumiko Saito-Nakano,<sup>Aff1</sup>

Corresponding Affiliation: Aff1

Email: yumiko@nih.go.jp

Kazuyuki Tanabe,<sup>Aff2</sup>

Email: kztanabe@biken.osaka-u.ac.jp

Toshihiro Mita,<sup>Aff3</sup>

Email: hiro-tm@research.twmu.ac.jp

---

Aff1 Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

Aff2 Laboratory of Malariology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Suita, Osaka, Japan

Aff3 Department of International Affairs and Tropical Medicine, Tokyo Women's Medical University School of Medicine, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

## Abstract

### Background

Understanding the geographical distribution of drug resistance of *Plasmodium falciparum* is important for the effective treatment of malaria. Drug resistance has previously been inferred mainly from records of clinical resistance. However, clinical resistance is not always consistent with the parasite's genetic resistance. Thus, molecular identification of the parasite's drug resistance is required. In Africa, clinical resistance to pyrimethamine (Pyr) and chloroquine (CQ) was evident before 1980 but few studies investigating the genetic resistance to these drugs were conducted before the late 1990s. In this study, genotyping of genes involved in resistance to Pyr and CQ was performed using archive blood samples from Africa between 1984 and 1998.

### Methods

Parasite DNA was extracted from *P. falciparum*-infected blood smears collected from travellers returning to Japan from Africa between 1984 and 1998. Genotypes of the dihydrofolate reductase gene (*dhfr*) and CQ-resistance transporter gene (*pfprt*) were determined by polymerase chain reaction amplification and sequencing.

### Results

Genotyping of *dhfr* and *pfprt* was successful in 59 and 80 samples, respectively. One wild-type and seven mutant *dhfr* genotypes were identified. Three *dhfr* genotypes lacking the S108N

resistant dhfr genotype (IRNI triple mutant) emerged from Southeast Asia and migrated to Africa, where it spread into endemic regions throughout Africa [14,18,19].

The identification of pfcrt and dhfr as target genes for drug resistance provides solid ground for exploring the geographical distribution and spread of CQ- and Pyr-resistant *P. falciparum*. However, previous reports of genetic resistance (but not clinical resistance) to these drugs are very limited before the 1990s, since the target genes for CQ- and Pyr-resistance were not identified until 2000 and 1988, respectively [8,10,20]. Indeed, studies on the genotypes of drug-resistant genes are scarce, with only one report each for pfcrt [21] and dhfr [22] in the late 1980s in Africa. Investigating the geographical distribution of pfcrt and dhfr genotypes in Africa before 1990 is undoubtedly crucial for tracing the evolutionary history of CQ- and Pyr-resistance in the continent, where both CQ- and Pyr-resistance was introduced from Southeast Asia. To address this issue, genotyping of archive blood samples was performed using samples collected from travellers who had returned from Africa between 1984 and 1998. Results show that in Africa the CQ-resistant pfcrt genotype was already widely prevalent in the 1980s, and the highly Pyr-resistant dhfr genotypes (double and triple mutants) increased after the mid-1990s.

## Methods

### Collection of samples and DNA extraction

The archive blood samples used in this study had been collected and stored as blood smears for the national surveillance system of imported malaria cases operating in 50 hospitals in Japan from 1984 to 1998 [23]. Of the 588 malaria cases imported to Japan during the period, 122 *Plasmodium falciparum* cases were derived from 23 African countries. Parasite DNA was extracted from Giemsa-stained thin blood smears as previously described [23]. Briefly, Giemsa-stained slides were dipped in xylene and then in methanol to remove the immersion oil and dye, respectively. Each blood smear was scraped off with the edge of a clean glass slide, and subjected to DNA purification using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). A non-infected blood smear was also used as a negative control in the DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) amplification procedures. In total, genotyping was successful for dhfr and/or pfcrt in 85 samples of the 122 samples examined [see Additional file 1].

### Molecular analysis

For genotyping of the dhfr locus, amplification of a 350-base pair fragment covering the four polymorphic sites at positions 51, 59, 108 and 164 was unsuccessful, due primarily to severe fragmentation of the templates extracted from the methanol-fixed blood smears, which were not suitable for amplification of fragments greater than 200-base pairs [24,25]. Thus, three 190-base pair fragments covering the polymorphic amino acid positions at 51 and 59, 108, and 164 were separately amplified by nested PCR [23]. The PCR products were subjected to direct sequencing in both directions. In samples with mixed infections of different genotypes showing superimposed peaks on an electropherogram, the PCR products were cloned into pT7Blue vector (Merck, Darmstadt, Germany) and sequenced. More than 10 plasmid clones were sequenced to ascertain linkage of the polymorphisms at 51 and 59 in dhfr; those clones in which linkage was not confirmed were excluded from further analysis. For genotyping of the pfcrt locus, a 190-base pair fragment of pfcrt encoding the amino acid residues at positions 72–76 was amplified by nested PCR as previously described [5].

### Statistical analysis

Comparisons between the prevalence of drug resistant genotypes before and after 1995 were examined using the Fisher exact test or Chi-square analysis. A p-value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

## Results

### Pyrimethamine-resistant genotype

mutation (NRSI, ICSI, IRSI; amino acids at positions 51, 59, 108, and 164 with mutations underlined) were highly prevalent before 1994 but reduced after 1995, accompanied by an increase in genotypes with the S108N mutation. The dhfr IRNI genotype was first identified in Nigeria in 1991 in the present samples, and its frequency gradually increased. However, two double mutants (ICNI and NRNI), the latter of which was exclusively found in West Africa, were more frequent than the IRNI genotype. Only two pfcr1 genotypes were found, the wild-type and a Southeast Asian type (CVNET; amino acids at positions 72–76 with mutations underlined). The CVNET genotype was already present as early as 1984 in Tanzania and Nigeria, and appeared throughout Africa between 1984 and 1998.

## Conclusions

This study is the first to report the molecular identification of Pyr- and CQ-resistant genotypes of *P. falciparum* in Africa before 1990. Genotyping of dhfr and pfcr1 using archive samples has revealed new aspects of the evolutionary history of Pyr- and CQ-resistant parasites in Africa.

## Keywords

*Plasmodium falciparum*, Drug resistance, Chloroquine, pfcr1, Pyrimethamine, dhfr, Africa, Archive sample

## Background

Drug resistance of *Plasmodium falciparum*, the most virulent human malaria parasite, is imposing a serious problem for the effective treatment of malaria in almost all endemic areas. Thus it is imperative to understand the geographical distribution and origin of the parasite's drug resistance. In Africa, clinical resistance of falciparum malaria to chloroquine (CQ) was first reported in the late 1970s [1,2]. In addition, while clinical resistance to pyrimethamine (Pyr) had been reported in limited endemic foci in the 1950s after mass drug treatment using Pyr [3,4], highly resistant parasites became remarkably frequent and spread into endemic regions throughout Africa during the 1990s after the implementation of sulphadoxine/pyrimethamine (SP) as a first-line therapy in these regions [5]. Clinical resistance is not always consistent with genetic resistance because drug resistance results from the interplay of the parasite, drug, and human host, and is largely influenced by immune factors. In highly endemic areas in Africa, where individuals often possess semi-immunity against malaria after repeated infections, this semi-immunity more or less strengthens efficacy of anti-malarial drugs to drug-resistant parasites [6,7]. Thus, in Africa the timing of the first appearance of genetic resistance to CQ and Pyr and its subsequent spread in the continent remain to be explored.

The *P. falciparum* chloroquine-resistance transporter gene (pfcr1) was identified as a primary target gene for CQ resistance in 2000 [8]. PfCRT is a transmembrane protein, localized to the parasite's food vacuole [9]. An amino acid substitution at position 76 from lysine to threonine (K76T) in pfcr1 confers resistance to CQ [8]. Pyr inhibits a key enzyme in the folate biosynthetic pathway, dihydrofolate reductase (DHFR), which is encoded by the parasite dihydrofolate reductase gene (dhfr). Four major amino acid substitutions in dhfr have been widely recognised among Pyr-resistant parasites [10,11]. A mutation at position 108 from serine to asparagine (S108N), leading to the NCNI dhfr genotype (amino acids at positions 51, 59, 108, and 164 with mutation underlined), is essential for conferring a mild resistance to Pyr in the parasite [10-13]. Additional point mutations at 51, 59, and 164 are associated with increased levels of Pyr resistance in vitro [11]. Importantly, as the number of mutations in dhfr increases, levels of resistance to Pyr become higher [13]. The IRNL dhfr genotype of the quadruple mutant shows so far the highest IC<sub>50</sub> values to Pyr (1,111-fold as compared to that of the wild-type parasite) [13]. The IRNL dhfr genotype is predominant in Southeast Asia and South America where the efficacy of SP has already reached unacceptable levels [14].

Recent molecular studies using microsatellite markers showed that the geographical origins of the mutant pfcr1 genotypes were extremely restricted and resistant genotypes spread into almost all endemic regions, due to a selective sweep driven by treatment with CQ [14-17]. The CVNET (amino acids at positions 72–76 in pfcr1 with mutations underlined) genotype represents the most common CQ-resistant type in Southeast Asia, which expanded to Africa. Similarly, a highly Pyr-

Genotyping of *dhfr* was successful in 59 of the 122 archive samples, of which 37 (63%) showed mixed infections of different *dhfr* genotypes (Figures 1a and 2a). In addition to the wild-type (NCSI), seven mutant genotypes were identified: three with a single mutation (NRSI, ICSI, IRSI), three with double mutations (ICNI, NRNI, IRNI), and one with a triple mutation (IRNI). The most Pyr-resistant genotype (IRNL) known so far was not found in the present study. Of note, the three mutant genotypes lacking the S108N mutation (NRSI, ICSI, IRSI) were more prevalent before 1994 than after 1995 ( $p < 0.0001$ , Fisher exact test).

Figure 1 Yearly change in the number of *dhfr*- and *pfprt*-genotypes in Africa between 1984 and 1998. (a) Wild-type (NCSI), pyrimethamine-sensitive (NRSI, ICSI, IRSI) and pyrimethamine-resistant (NCNI, ICNI, NRNI, IRNI) *dhfr* genotypes were identified in blood samples collected from cases of *Plasmodium falciparum* malaria in Africa between 1984 and 1998. The height of each coloured bar shows the number of samples in that year infected with that particular genotype. (b) Wild-type (CVMNK; white bars) and chloroquine-resistant (CVIET; black bars) *pfprt* genotypes were identified in blood samples collected as above. The height of each bar shows the number of samples in that year infected with that genotype.

Figure 2 Time-line scheme for *dhfr* and *pfprt* genotypes determined using samples from Africa between 1984 and 1998. (a) Wild-type (NCSI), pyrimethamine-sensitive (NRSI, ICSI, IRSI) and pyrimethamine-resistant (NCNI, ICNI, NRNI, IRNI) *dhfr* genotypes of *Plasmodium falciparum* are shown by the different coloured symbols, as listed at the bottom of the figure. In samples with mixed genotype infections, the different genotypes are listed together and underlined. Values in parentheses are the number of samples. \*One individual that returned from Ghana in 1993 also visited Burkina Faso in the same trip. (b) Wild-type (CVMNT) and chloroquine-resistant (CVIET) *pfprt* genotypes of *P. falciparum* are shown by white and black circles, respectively. In samples with mixed genotype infections, the different genotypes are listed together and underlined. Values in parentheses are the number of samples. \*One individual returning from Ghana in 1993 and one individual returning from Togo in 1990 also visited Burkina Faso in the same trip.

The IRNI genotype, which is currently predominant in many endemic regions in Africa [26], was first identified in Nigeria in 1991 in the present samples (Figure 2a). Since then, the frequency of IRNI genotype gradually increased (Figure 1a), but it was not highly predominant in both East Africa (16%) and West Africa (18%) in 1991–1998. Instead, the double mutant genotypes (ICNI and NRNI) were predominant during that period in the present sample set. The NRNI genotype was identified exclusively in West African countries: Nigeria, Ghana, Cote d'Ivoire, and Niger (Figure 2a). On the other hand, the ICNI genotype was prevalent in both East and West Africa.

### Chloroquine-resistant genotype

Genotyping of *pfprt* was successful in 80 of the 122 archive samples. Only two *pfprt* genotypes were found; the wild-type (CVMNK) and the CQ-resistant genotype (CVIET) of Southeast Asia (Figure 1b). Mixed infections of wild-type and CVIET type were found in 22 (28%) samples. The SVMNT *pfprt* genotype that originated in either Melanesia or South America was not detected. The CVIET genotype was already present as early as 1984 in Tanzania and Nigeria in the present samples (Figure 2b), and appeared throughout the studied period (1984–1998). There was no difference in the prevalence of the CQ-resistant *pfprt* genotype (CVIET) before 1994 and after 1995 ( $p > 0.8$ , Chi-square analysis). The prevalence of CQ-resistant *pfprt* genotype between West and East Africa was comparable ( $p > 0.48$ , Chi-square test).

## Discussion

The present study is the first to report *pfprt* and *dhfr* genotypes in Africa before 1990 using archive samples. It was found that before the mid-1990s the predominant *dhfr* genotypes were wild-type (NCSI) and three mutant genotypes (NRSI, ICSI, IRSI), all of which lacked the S108N mutation. This is unexpected because it was believed that the initial mutation in *dhfr* was exclusively the S108N mutation, which confers weak resistance to Pyr on *P. falciparum* [10-13]. Experimental investigations have recently demonstrated that mutant genotypes lacking the S108N mutation (NRSI, ICSI, IRSI) are as sensitive to Pyr as the wild-type parasite [13,27]. Notably, the prevalence of these three mutant genotypes (NRSI, ICSI, IRSI) lacking the S108N mutation, as well as the wild-type, was remarkably reduced after the mid-1990s. Instead, *dhfr*