

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究班
分担研究報告書（平成 25 年度）

日本国内小児患者由来肺炎球菌の
β-ラクタム剤耐性およびニューキノロン系抗菌薬に対する低感受性化の解析

研究分担者 大西 真 国立感染症研究所細菌第一部 部長
研究協力者 常 彬 国立感染症研究所細菌第一部 主任研究官

研究要旨

2013 年に日本国内の小児侵襲性肺炎球菌感染症（IPD）由来肺炎球菌 141 株の血清型別、薬剤感受性およびシークエンスタイピングを行った。141 症例のうち、ペニシリン G 耐性肺炎球菌（PRSP; MIC 2 μg/mL）は 16 症例（11.3%）、メロペネム耐性菌（MIC 1 μg/mL）は 2 症例（1.4%）より分離された。16 株の PRSP のうち、Sequence type (ST) 320 型 19A 肺炎球菌は 9 株で最も多かった。すべての IPD 由来肺炎球菌はニューキノロン系薬 トシル酸トスフロキサシンに感受性（MIC 0.12-0.5 μg/mL）を示した。我々はペニシリン G とメロペネム耐性 IPD 由来肺炎球菌の解析を行い、耐（低感受）性のメカニズムを探索した結果を報告する。

A. 研究目的

7 価肺炎球菌コンジュゲートワクチン（PCV7）は、日本には 2010 年 2 月に導入され、2013 年 4 月 1 日から定期接種の対象となり、さらに 2013 年 11 月 1 日からは PCV7 に新たに 6 種類の血清型ポリサッカライドを加えた 13 価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV13）に定期接種用ワクチンは変更された。肺炎球菌コンジュゲートワクチンの定期接種化による感染症の発症率の減少が期待されている。それに加えて、化学療法剤に対する低感受性/耐性肺炎球菌の分離の低下も期待されている。本分担研究は、2013 年日本国内の小児侵襲性感染症（IPD）から分離された肺炎球菌の薬剤感受性試験を行い、抗菌薬に対する感受性を調べた。さらに、β-ラクタム剤耐性のメカニズムを解明する解析を試みた。

B. 研究方法

2013 年に、日本国内の小児 IPD から分離された肺炎球菌 141 株を対象とした。分離された肺炎球菌に対して、Statens Serum Institute 製血清を用い血清型を決定した。薬剤感受性試験は微量液体希釈法によって行った。薬剤感受性試験の結果は 2007 年までの CLSI の基準によって、ペニシリン G の MIC が 0.06 μg/mL、0.12-1 μg/mL、2 μg/mL をそれぞれ、ペニシリン感受性（PSSP）、ペニシリン低感受性（PISP）、ペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP）と判別した。マルチローカスシークエンスタイピング（MLST）では、

分離株の 7 つのアリル（*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl*）の配列を決定し、<http://spneumoniae.mlst.net> にて検索を行い、遺伝子型を決定した。

C. 研究結果

本報告書のすべての集計は症例数をもとに行なった。

1: 2013 年小児 IPD から分離された肺炎球菌の抗菌薬に対する感受性

2013 年、141 例小児 IPD 由来肺炎球菌の中、PSSP、PISP、PRSP はそれぞれ 84 株（59.6%）、41 株（29.1%）、16 株（11.3%）であった。PISP と PRSP 57 株のうち、19A 型肺炎球菌が最も多かった（33 株、57.9%）。15A は 13 株（22.8%）が分離され、二番目に多かった。一方、PCV7 に含まれる血清型のうち、19F は 3 株（5.3%）、6B は 2 株（3.5%）のみの分離であった。残った 6 株の血清型はそれぞれ 6A、6C、15B、16F、23A、35B であった。16 株 PRSP には、ST320 型 19A 肺炎球菌は 9 株、15A 型は 4 株、19F 型は 2 株、35B 型は 1 株であった。

メロペネムに対して、120 株（85.1%）の肺炎球菌は感受性を示し、19 株（13.5%）および 2 株（1.4%）はそれぞれ低感受性と耐性を示した。メロペネム低感受性肺炎球菌の血清型は 19A（8 株）、15A（8 株）、19F（2 株）、35B（1 株）で、耐性を示す 2 株ともにシークエンスタイプ ST320 型 19A 肺炎球菌であった。

すべての小児 IPD 由来肺炎球菌はパニペネム、

バンコマイシンおよびトシル酸トスフロキサシンに感受性を示した。

2:肺炎球菌のβ-ラクタム剤耐性メカニズムの解析
肺炎球菌の *pbp1a*, *pbp2b* および *pbp2x* 遺伝子の変異は本菌のβ-ラクタム剤の低感受性および耐性に関与すると言われている。しかし、この3つの遺伝子のそれぞれが肺炎球菌のβ-ラクタム剤耐性に果たす役割は不明である。肺炎球菌のβ-ラクタム剤耐性メカニズムを解明するために、我々はメロペネム耐性 PRSP、血清型 6B KSP482 株の *pbp1a*, *pbp2b* および *pbp2x* 遺伝子を別々にβ-ラクタム剤感受性を示す肺炎球菌血清型 2 型の D39 にトランスフォーメーションし、それぞれの役割を探索する計画を立てた。

本年度、我々は KSP482 の *pbp2b* 遺伝子を PCR で増幅し、野生型 D39 にトランスフォーメーションし、D39 のβ-ラクタム剤に対する MIC の変化を解析した。その結果、変異 *pbp2b* 遺伝子を有する D39 のペニシリン G に対する MIC は野生型の 0.015 μg/mL から 0.03 μg/mL、セフトキシムに対する MIC は 0.03 μg/mL から 0.03 μg/mL、メロペネムに対する MIC は野生型の 0.008 μg/mL から 0.06 μg/mL への上昇がみられた(図 1)。しかし、KSP482 の抗菌薬の MIC には達していなかった。今後、*pbp1a* および *pbp2x* 遺伝子をそれぞれに変異 *pbp2b* 遺伝子を有する D39 にトランスフォーメーションし、β-ラクタム剤耐性のメカニズムを解明する予定である。

D. 考察

昨年、我々は 2011 年および 2012 年の日本国内の小児 IPD から PSSP の分離率がそれぞれ 45.9% と 44.8% であったことを、本研究班の分担報告書にて報告した。2013 年の小児 IPD 由来 PSSP の分離率は 59.6% で、2011 年と 2012 年より感受性菌の分離率が高くなった。その理由としては、PCV7 の普及によりワクチンに含まれているペニシリン G に対する感受性の低い血清型 6B、23F、19F 肺炎球菌の分離率が低くなったことが考えられた。PCV7 は小児の IPD の予防効果と共に、耐性菌の減少にも重要な役割を果たした。2013 年に分離された PISP と PRSP のうち、19A 型は最も多くみられた。19A 型は 2013 年 11 月 1 日に変更された PCV13 に含まれる血清型であるため、PCV13 の普及により 19A 型肺炎球菌による IPD 症例の減少および PISP と PRSP の低下が期待される。

E. 結論

日本国内小児 IPD 由来、ペニシリン G に対する低感受性および耐性を示す肺炎球菌の分離率の低下がみられた。その一方、非ワクチンタイプ

の 15A 型や 35B 型肺炎球菌はペニシリン G およびメロペネムに低感受性を示しており、PCV13 普及後の抗菌薬感受性の動向に注目した継続的な疫学研究が重要である。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
論文発表

1. Molecular epidemiology and serogroup 6 capsular gene evolution of pneumococcal carriage in a Japanese birth cohort study. Otsuka T, Chang B, Wada A, and Okazaki M. Journal of Medical Microbiology, 62: 1868-75, 2013.

2. Changes in *Streptococcus pneumoniae* Serotypes in the Nasopharynx of Japanese Children after Inoculation with a Heptavalent Pneumococcal Conjugate Vaccine. Ueno M, Ishii Y, Tateda K, Anahara Y, Ebata A, Iida M, Mizuno F, Inamura S, Takahata K, Suzuki Y, Chang B, Wada A, Sugita M, Tanaka T, Nishiwaki Y. Japanese Journal of Infectious Diseases, 67: 40-43, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

