

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

分担課題 日本国内小児患者由来肺炎球菌の β -ラクタム剤抗菌薬に対する低感受性化に関する研究

研究分担者 大西 真 国立感染症研究所細菌第一部 部長

研究要旨

この研究では我々は日本国内の小児侵襲性肺炎球菌感染症（IPD）由来肺炎球菌 421 株の血清型別、薬剤感受性およびシーケンシングを行った。髄膜炎症例 55 例のうち、ペニシリン G 耐性肺炎球菌（PRSP; MIC 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）が分離されたのは 22 例（40.0%）、セフトキシム非感受性菌（MIC 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）が 8 例（14.5%）であった。一方、髄膜炎以外の IPD 由来肺炎球菌のうち、PRSP（MIC 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）がなかった。セフトキシム非感受性菌（MIC 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）が 13 例（3.6%）であった。メロペネム耐性菌（MIC 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）は 7 症例（1.7%）より分離された。これらの β -ラクタム剤抗菌薬に低感受性を示す肺炎球菌のうち、Sequence type (ST) 320 型 19A 肺炎球菌および 15A 型が多くみられた。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。加えて、淋菌の薬剤感受性試験に関して若干の検討を行ったので報告する。

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 IPD の罹患率の減少がみられた。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、研究期間中、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

1: 小児 IPD 症例由来肺炎球菌

2012-2014 の 3 年間に、日本国内の小児 IPD から分離された肺炎球菌 株を対象とした。血液寒天培地にて 37°C、5% CO₂ の条件下で一晩培養した肺炎球菌を用いて解析を行った。

2: 血清型別

肺炎球菌の血清型は Statens Serum Institut 製血清を用いて、莢膜膨潤法により決定した。

3: 薬剤感受性試験

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 2008 年から使われた CLSI の基準によって判別を行った。すなわち、髄膜炎由来肺炎球菌のペニシリン G（PCG）の MIC が 0.06

μg/mL、0.12 μg/mL をそれぞれ、ペニシリン感受性 (PSSP)、ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) と判別し、セフトキシム (CTX) に対する MIC が 0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL をそれぞれ、CTX 感受性、低感受性、耐性と判別した。髄膜炎以外の IPD 由来肺炎球菌については PCG の MIC が 2 μg/mL、4 μg/mL、8 μg/mL をそれぞれ、PSSP、ペニシリン低感受性 (PISP)、PRSP と判別し、CTX に対する MIC が 1 μg/mL、2 μg/mL、4 μg/mL をそれぞれ、CTX 感受性、低感受性、耐性と判別した。また、分離部位に関係なく、メロペネム (MEPM) に対する MIC が 0.25 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL をそれぞれ、MEPM 感受性、低感受性、耐性と判別した。

4: マルチローカスシーケンスタイピング (MLST) 解析

MLST では、分離株のゲノム DNA を精製し、肺炎球菌のゲノム上にある 7 つのハウスキーピング遺伝子 (*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、sequence type (ST) を決定した。

5: 淋菌の薬剤感受性試験

GC 寒天培地 (BD 社)、IsoVitalex (BD BBL)、チョコレート寒天培地 (Nissui Chocolate agar EXII)、ゴノテスト GC 寒天 (アップル科学) を用いて Etest ならびに Disk 法を実施した。Etest ならびに Disk 法は常法にて行った。菌株として、H041, FC0312, ITOH034, HI042, ITOH061, FC0323, FC0339, FC0340, FC0341, FC0363, FC0369, WHO-L 株を用いた。

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: 2012-2014 年小児 IPD から分離された肺炎球菌の β-ラクタム系抗菌薬に対する感受性

2012-2014 年、421 例小児 IPD 由来肺炎球菌の中、髄膜炎症例は 55 例であった。

これらの髄膜炎症例のうち、PSSP および PRSP はそれぞれ 33 株 (60.0%) と 22 株 (40.0%) であった。PRSP 株の血清型は様々で、そのうち、15A 型肺炎球菌が最も多かった (10 株、45.5%)。19A は 3 株 (13.6%) 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 2 株 (9.1%)、6B は 1 株 (4.5%) の分離であった。残った 6 株の血清型はそれぞれ 6C、15C、16F、23A、35B、non-typeable であった。CTX 低感受性髄膜炎由来肺炎球菌は 7 株がみられ、血清型は 15C (2 株)、15A (1 株)、16F (1 株)、19A (1 株)、19F (1 株) および 6B (1 株) で、CTX 耐性菌が 1 株で、血清型 15A 型であった。

一方、366 例非髄膜炎 IPD 由来肺炎球菌のうち 8 株が PISP で、PRSP が分離されなかった。8 株の PISP のうち、7 株は ST320 19A 型で、1 株は 15A 型であった。CTX 低感受性肺炎球菌は 9 株が分離され、血清型は 19A (4 株)、15A (3 株)、15B (1 株) および 15B (1 株) で、CTX 耐性菌が 4 株で、血清型 15A (2 株)、19A (1 株) および 10A (1 株) 型であった。

MEPM に対して、421 株のうち、360 株 (85.5%) の肺炎球菌は感受性を示し、54 株 (12.8%) および 7 株 (1.7%) はそれぞれ低感受性と耐性を示した。MEPM 低感受性肺炎球菌の血清型は PCV13 に含まれる 19A (20 株)、6A (3 株)、6B (2 株)、19F (2 株)、23F (1 株) 以外に、非 PCV13 タイプの 15A (21 株)、35B (4 株) および 15B (1 株) で、耐性を示す 7 株は ST320 型 19A 6 株と 15A 1 株であった。

2: 肺炎球菌の β-ラクタム系抗菌薬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-ラクタム系抗菌薬の低感受性および耐性に関与すると言われていている。しかし、この 3 つの遺伝子のそれぞれが肺炎球菌の β-ラクタム系抗菌薬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 MEPM 耐性 PRSP、血清型 6B、小児

IPD 由来 KSP482 株の *pbp1a*, *pbp2b* および *pbp2x* 遺伝子を別々に β -ラクタム系抗菌薬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実験を行った。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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、CTX に対する MIC は 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、MEPM に対する MIC は野生型の 0.008 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。

3: 淋菌の薬剤感受性試験

GC agar (BD) に IsovitaleX (1%) を添加した培地 (GC 寒天培地-BD) とチョコレート寒天培地を用いて各種薬剤の MIC を測定した場合に、相違が見られるか検討した。6 剤の MIC を 6 株について検討したが、相違はアジスロマイシンにおいて 6 株中 1 株において 3 倍の差が認められていたが、それ以外では同一あるいは 2 倍以内の差におさまった。

GC 寒天培地-BD とゴノテスト GC 寒天培地とを用いてアジスロマイシン感受性試験を実施し比較した。アジスロマイシンの MIC はゴノテスト GC 寒天培地を用いることで、3~4 倍程度低くなることが示された。参照株 WHO-L を用いた検証から GC 寒天培地-BD から得られる MIC 値が正しい値であることが推察された。

GC 寒天培地-BD とチョコレート寒天培地を用いてディスク法を実施した。GC 寒天培地-BD を用いた Etest で得られた MIC 値 (0.125, 0.094, 0.063 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を示す各 3 株の解析から、チョコレート寒天培地で形成される発育阻止円は、GC 寒天培地-BD で形成されるそれに比較して、小さくなることが示された(図 2)。

D. 考察

本分担研究では、2012 年から 2014 年までの日本国内の小児 IPD から分離された肺炎球菌の抗菌薬に対する薬剤感受性を調べて、非感受性の菌株の分離率と血清型分布

の変化を観測し続けた。この 3 年の間に β -ラクタム系抗菌薬に対する非感受性を示す肺炎球菌の分離率に明らかな増加がみられなかった。しかし、PCV13 に含まれない血清型の低感受性肺炎球菌、特に 15A 型の分離率の増加傾向がみられた。その理由としては、PCV7 および PCV13 の普及によりワクチンに含まれる β -ラクタム系抗菌薬に対する感受性の低い血清型 6B、23F、19F、19A 型肺炎球菌の分離率が低くなったことが考えられた。PCV ワクチンは小児の 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。また、近年に分離された β -ラクタム系抗菌薬のうち、ST320 19A 型が多くみられた。19A 型は PCV13 に含まれる血清型であるため、PCV13 の普及により β -ラクタム系抗菌薬に非感受性を示す肺炎球菌による症例の減少が期待される。

淋菌の薬剤感受性試験は GC 寒天培地-BD を用いた平板希釈法あるいは Etest が世界的に使用される。また、ディスク法を用いる場合でも GC 寒天培地-BD を用いて、現在最も問題となっているセフトリアキソン感受性株 (CLSI では 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下) に対する発育阻止円は 35 mm とされる (米国 CDC)。

しかしながら、GC 寒天培地-BD を一般の検査室ならびに試験機関で、淋菌株が分離されるたびに作成することは事実上困難である。淋菌用に市販されている生培地に関しては薬剤感受性試験で用いるためには十分な検証が必要であることを示した。本研究ではセフトリアキソンに関してはチョコレート寒天培地を用いた Etest を準用出来る可能性を示した。また、チョコレート寒天培地を用いたセフトリアキソンディスクを用いた場合の、判定基準を定めることは困難であった。CLSI の提唱している感受性株の基準、0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、は現在では臨床的效果と一致しないことが指摘されており、世界的には(米国 CDC も含め) 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の株の出現、広がりを監視する傾向にある。より詳細な基準を検討する必要があるが、30~35 mm の間に設定することで、0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の紛れ込みを最小限と

して、MIC 0.125 µg/ml より大きい値となる菌株のスクリーニングの可能性がある。

E. 結論

日本国内小児 IPD 由来、β-ラクタム系抗菌薬に対する低感受性および耐性を示す肺炎球菌のうち、非ワクチンタイプの 15A 型や 35B 型肺炎球菌が多く分離され、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。

薬剤耐性淋菌、特にセフトリアキソン耐性株の監視のための体系的な監視機構を構築する必要がある。公的機関によってどのようなサポートが必要であるか、関わって行けるか、更なる検討が必要である。

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. T. Otsuka, B. Chang, A. Wada, and M. Okazaki. *Journal of Medical Microbiology*, 62: 1868-1875, 2013.

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

3) Incidence of childhood pneumonia and serotype and sequence-type distribution in *Streptococcus pneumoniae* isolates in

Japan. J. Tanaka, N. Ishiwada, A. Wada, B. Chang, H. Hishiki, T. Kurosaki, and Y. Kohno. *Epidemiology and Infection* 140:1111-1121, 2012.

4) Prevalence and risk factors of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children in Japan. M. Ueno, Y. Ishii, K. Tateda, Y. Anahara, A. Ebata, M. Iida, S. Inamura, K. Takahata, Y. Suzuki, B. Chang, A. Wada, M. Sugita, T. Tanaka, Y. Nishiwaki. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 66:22-25, 2013.

5) Low opsonic activity to the infecting serotype in pediatric patients with invasive pneumococcal disease. T. Oishi, N. Ishiwada, K. Matsubara, J. Nishi, B. Chang, K. Tamura, Y. Akeda, T. Ihara, M. H. Nahm, K. Oishi, the Japanese IPD Study Group. *Vaccine*. 31:845-849, 2013.

学会発表

1) 脾摘の既往のない健康成人に発症した劇症型肺炎球菌敗血症の 1 症例。久保徳彦、岡崎友里、澤部俊之、中本貴人、村武明子、常彬、和田昭仁。第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会、長崎、2012 年 4 月。

2) 7 価肺炎球菌結合型ワクチン接種普及による乳幼児下気道感染症例の上咽頭から検出された肺炎球菌株における血清型および遺伝子型の変化。成相昭吉、常彬。第 16 回日本ワクチン学会学術集会。横浜、2012 年 11 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

S. pneumoniae serotype 6B
 KSP482 MIC_{PCG} = 2 µg/ml, MIC_{CTX} = 2 µg/ml, MIC_{MEPM} = 1 µg/ml

PCR product of *pbp2b* KSP482
 Recipient D39 (MIC_{PCG} ≤ 0.015 µg/ml, MIC_{CTX} ≤ 0.03 µg/ml, MIC_{MEPM} ≤ 0.008 µg/ml)

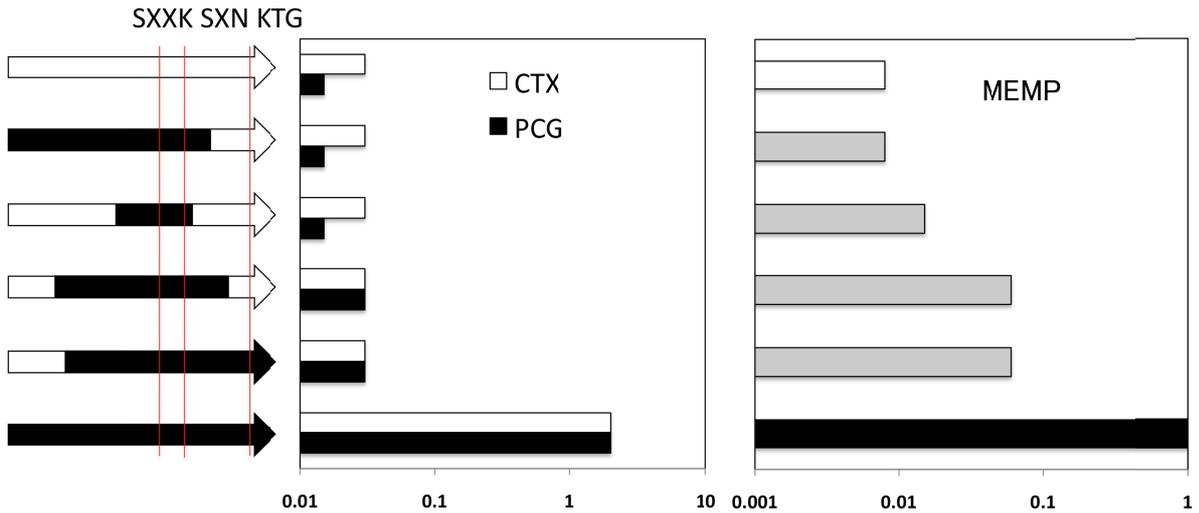


図1: *pbp2b* の肺炎球菌の β-ラクタム剤耐 (低感受) 性に果たす役割

図2 淋菌の薬剤感受性試験 (チョコレート寒天培地 / ディスク拡散法)

