

主題 ○子どもの感染症, 現在 (いま)

治療上問題となる耐性菌

—その検出法と分子疫学—

生 方 公 子*

はじめに

先の第 39 回日本小児感染症学会において企画された「シンポジウム：こどもの感染症, 現在」の演者として, 市中呼吸器感染症の主要な原因細菌のなかから, 治療上特に問題となると思われる肺炎球菌, インフルエンザ菌, 肺炎マイコプラズマ, β 溶血性レンサ球菌の耐性化の現況についてお話しさせていただいた。

本稿においては, 当日お話しした小児由来株の耐性化の現状について述べるとともに, 耐性菌増加への対応策としてのワクチン接種を踏まえた予測カバー率, 治療抗菌薬の選択とその使用期間の判断に益すると考えられる real-time PCR による原因微生物の迅速診断法についても述べた。

I. 市中呼吸器感染症原因細菌にみられる耐性化の本質

現在, 小児において問題となっている耐性菌による感染症を考えると, 抗菌薬が広く普及し始めた 1970 年代当時に, どのような耐性菌感染症がみられたのかを知っておく必要がある。当時の日本では, 黄色ブドウ球菌による膿胸などを含む化膿性疾患が多かったが, それらの菌では β -ラクタマーゼ産生によるペニシリン (PC) 耐性に加え, テトラサイクリン (TC), クロラムフェニコール (CP), あるいはマクロライド (ML) 系薬耐性が注目された。その他の菌では, ML 耐性の A 群

溶血性レンサ球菌 (GAS) の流行や, インフルエンザ菌では TEM 型 β -ラクタマーゼ産生菌による化膿性髄膜炎も問題であった。

これら耐性菌にみられる特徴は, 耐性にかかわる多くの遺伝子が染色体外のプラスミド上に存在し, 溶原化ファージなどを介して感性菌へと容易に伝達させることができたことである。耐性遺伝子の組み込まれたプラスミドは, 抗菌薬が開発される以前から菌が保持していたもので, それらを保持する菌株が抗菌薬の使用によって選択されて生き残り, 次第に増加してきたと考えられる¹⁾。

一方, 今日, 市中呼吸器感染症の主要な原因細菌において問題化している耐性菌の耐性化機構を表 1 に示す。第 1 には, β -ラクタム系薬の作用標的である細胞壁合成酵素の PBP の多様な変異による耐性化があげられ, 肺炎球菌やインフルエンザ菌が相当する。第 2 には ML 系薬の作用標的である 23S rRNA の修飾や変異による耐性化であるが, 肺炎球菌, マイコプラズマ, そして GAS や GBS に認められる。第 3 には, 細菌細胞内に取り込まれた ML 系薬やニューキノロン系薬 (FQ) の積極的な排出による耐性化で, 肺炎球菌, GAS, インフルエンザ菌に認められる。第 4 には FQ の作用標的である DNA ジャイレースやトポイソメラーゼの変異による耐性化であるが, FQ に耐性を示す菌ではこれらの変異を伴っている。

このような耐性化は, “菌の生存にとって必須の構成物である酵素 (蛋白) の質的变化による耐性

* 北里大学大学院感染制御科学府/同 北里生命科学研究所病原微生物分子疫学研究室
[〒 108-8641 東京都港区白金 5-9-1]

表 1 呼吸器感染症の主たる起炎菌における耐性化機構

菌種名	薬剤	薬剤の標的 (菌体構成物)	遺伝子	遺伝子にコードされた 産生物の機能					
肺炎球菌	β-ラクタム系薬	PBP1A	pbp1a	細胞壁合成酵素					
		PBP2X	pbp2x						
		PBP2B	pbp2b						
肺炎球菌	マクロライド系薬	23S rRNA	ermB	リボソームの修飾 菌体内薬物の排出					
		MefA	mefA						
		DNA ジャイレース トポイソメラーゼIV	gyrA, gyrB parC, parE						
肺炎球菌	ニューキノロン系薬	PmrA	pmrA	菌体内薬物の排出					
		β-ラクタム系薬	PBP3	ftsI	細胞壁合成酵素 菌体内薬物の排出				
			AcrA, AcrB	acrA, acrB					
DNA ジャイレース トポイソメラーゼIV	gyrA, gyrB parC, parE								
肺炎球菌	ニューキノロン系薬	PmrA	pmrA	菌体内薬物の排出					
		マイコプラズマ・ ニューモニエ	マクロライド系薬	23S rRNA	リボソームの機能変化				
						肺炎球菌	マクロライド系薬	23S rRNA	ermA, ermB mefA
肺炎球菌	β-ラクタム系薬	PBP2X	pbp2x	細胞壁合成酵素					
					肺炎球菌				

化”と表現されるが、菌が分裂・増殖するのに差し支えない程度にこれらの構成物を巧みに変化させることが“耐性化の始まり”である。つまり、そのレベルは経口抗菌薬で得られる 1~2 μg/ml の濃度でも生存できる程度であることから、耐性化の初期には生物学的手法では正確に識別し難いところに問題を有している^{2,3)}。腸管感染症や尿路感染症など薬物濃度が高い部位に棲息して感染症を惹起する菌が、効率的に薬物を不活化する手段としてさまざまな不活化酵素を産生して耐性化しているのとは根本的に異なるのである。

II. 肺炎球菌

肺炎球菌のβ-ラクタム系薬耐性化に重要な酵素は、細胞壁を長軸方向へ伸長化させる PBP1A、隔壁合成の PBP2X、そして本菌特有のランセット形成にかかわる PBP2B の 3 種類である⁴⁾。薬剤作用との関係でみると、カルバペネム系薬やペニシリン系薬は PBP1A, 2B に強く結合して優れた殺

菌性を示し、セフェム系薬は PBP2X に強く結合して隔壁合成阻害により抗菌力を発揮する。PBP2X に結合するセフェム系薬の殺菌性はペニシリン系薬に比して劣る。

肺炎球菌にみられるこれらの PBP 遺伝子変異は、口腔内常在のレンサ球菌の PBP 遺伝子と肺炎球菌の PBP 遺伝子とが組み換えを生じ、その結果生じたハイブリッド遺伝子である。インフルエンザ菌のβ-ラクタム系薬耐性にみられる点変異とは異なっている。

図 1 は、2006 年に侵襲性感染症から分離された肺炎球菌に対する基準薬のペニシリン G の感受性分布と PCR によって解析した遺伝子データを重ねあわせた成績である。MIC 分布は極めて曖昧な二峰性分布であるが、遺伝子が 3 つとも変異した株、2 種変異した株などと遺伝子変異パターン別に眺めると、それぞれのパターンでは 90% 近い株の MIC が試験管 3 管以内におさまっている。ペニシリン耐性肺炎球菌の識別方法としては、PCR によって

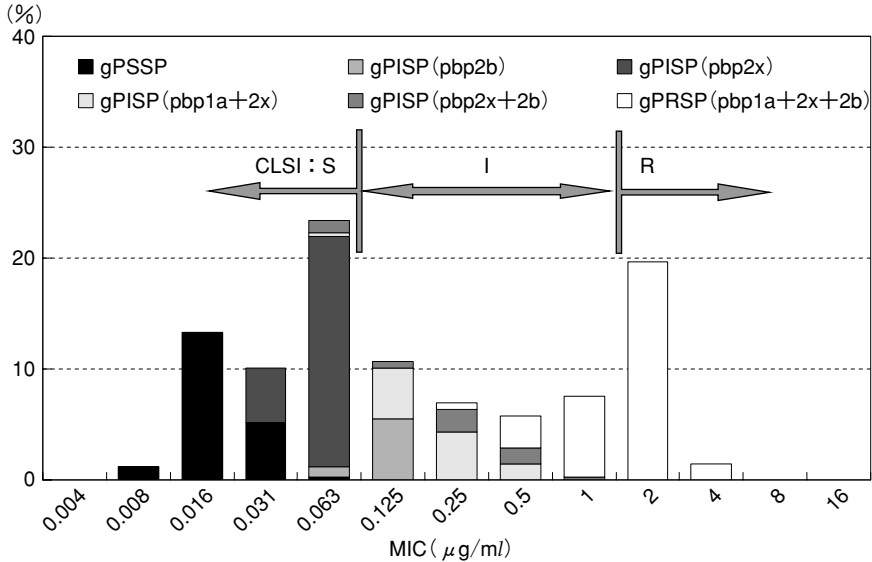


図 1 Penicillin G の感受性分布と PBP 遺伝子変異との関係

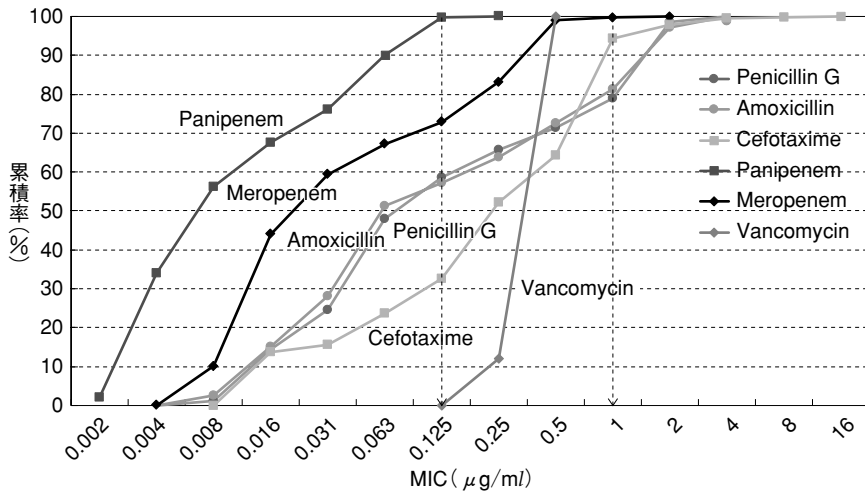


図 2 肺炎球菌に対するβ-ラクタム系薬の感受性累積分布

PBP 変異検索を行ったほうが、治療抗菌薬を選択するうえで合理的であろうと考えている⁵⁾。

なお、米国 Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) の勧告する“S”，“I”，“R”の識別は、肺炎などに対する注射薬で得られる薬物濃度に適用されるものである。化膿性髄膜炎の場合には、“I”は“R”として対応することと記載されている。わが国のように投与量が相対的に少なく、さらに病巣濃度の低い経口抗菌薬には適用できな

い。

ちなみに、欧米での分離株とわが国の分離株で明らかに異なるのは、セフェム系薬の感受性低下に影響する PBP2X 単独変異株がわが国では多く、ペニシリンが多く処方されている欧米では少ないことである。

図 2 には参考までに注射薬の肺炎球菌全体に対する感受性累積分布を示す。肺炎での薬物濃度の指標として 1 µg/ml、化膿性髄膜炎の指標として

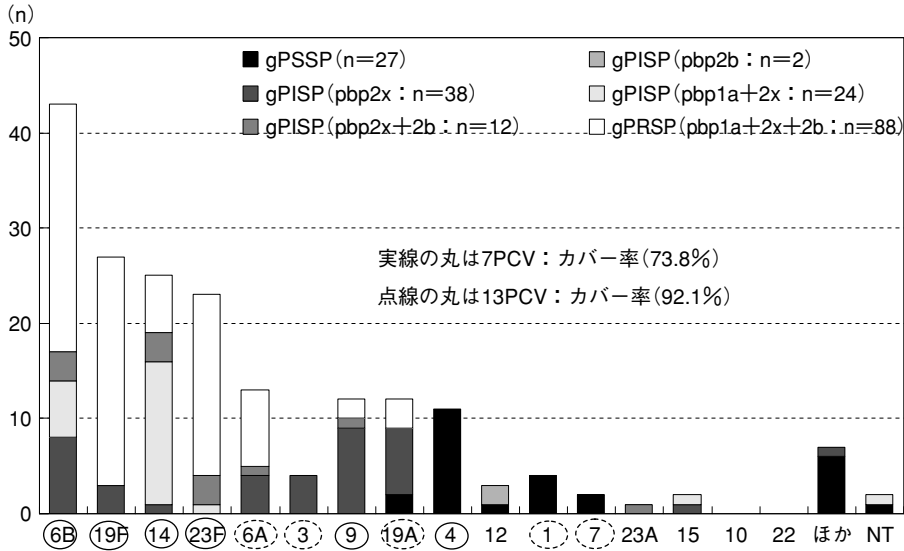


図 3 小児侵襲性感染症由来の肺炎球菌の莢膜型

0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に点線を引いたが、一部の薬剤では無効例となる可能性もあるので注意が必要である。

ここにはその成績は示さなかったが、肺炎球菌の80%以上はすでにML系薬に耐性化している。耐性化の原因の一つは、以前からよく知られている *erm*(B) 遺伝子によるリボソームをジメチル化する酵素によるもので、この遺伝子を保持すると既存のML系薬すべてに高度耐性化する。もう一つは *mef*(A) 遺伝子保持株で、菌体内へいったん取り込まれたMLを排出する膜蛋白を産生してEM, CAM, AZMに1~8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と軽度耐性化している。耐性菌のなかに占める割合は前者が65%、後者が35%前後である。

ここで、肺炎球菌に対するワクチンについて触れておきたい。欧米においては耐性肺炎球菌感染症に対する予防対策として、本菌の病原性にかかわる莢膜(多糖体)に対する7価コンジュゲートワクチン(7PCV)が作られ、すでに接種が施行されて5年経過し、その効果と莢膜型の変化について次々と報告がなされている。一定の感染防御効果は明らかにされているが、莢膜の型が90種もある本菌では、接種後分離される菌の莢膜型が替わってきているとする報告がみられる。わが国においてもいずれ7PCVが登場するであろうが、現状におけるカバー率は図3に示したように、7PCV

(6B, 19F, 14, 23F, 4, 9V, 18C)にはPRSPが多い6B, 19F, 14, および23Fが含まれ、分離菌全体の70%をカバーしている。しかし、19Aや6A,あるいは重症化しやすい中耳炎の原因菌であるムコイド型の3型がカバーされておらず、そのことを考えると可能であれば13PCV接種のほうが望ましい。

III. インフルエンザ菌

本菌は肺炎球菌とともに上気道からポピュラーに分離され、常在菌として棲息していることが多い。このため、喀痰や咽頭拭い液から分離されたからといって、即原因菌とは判断できない菌でもある。分離菌がそのまま治療対象となるのは、莢膜b型(Hib)菌やその他の莢膜(a, c, d, e, f)を有するインフルエンザ菌が分離された場合と思われる。分離菌の90%以上を占めている莢膜を有しない型別不能株(NT株)を原因菌と確定するには、炎症所見や貪食像などの補助手段が必要となる。

わが国において、 β -ラクタマーゼによらない耐性インフルエンザ菌(BLNAR)は2000年前後から出現し始めたが、初期に分離されたBLNARのABPC感受性は、感性菌のピーク(0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)から微妙にずれて、1~2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度のMICを示

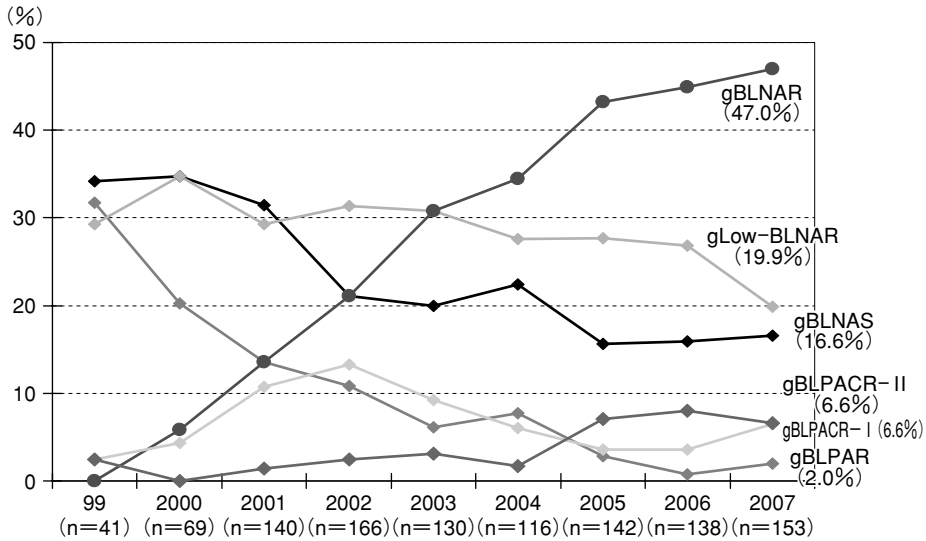


図 4 化膿性髄膜炎由来インフルエンザ菌の年次的耐性化動向

す菌であった。また、それらの株ではペニシリン系薬よりも経口セフェム系薬の感受性低下が大きかった。その現象が手がかりとなって、インフルエンザ菌においてもセフェム系薬の主たる作用標的である隔壁合成酵素の PBP3 をコードする遺伝子 (*ftsI*) に変異が始まっていることを見出した⁶⁾。

図 4 には、われわれが化膿性髄膜炎由来のインフルエンザ菌における遺伝子解析を目的として組織した「化膿性髄膜炎全国サーベイランス研究班」が、過去約 8 年間に小児科の先生方より精査の目的でお送りいただいた菌株における経年的な耐性菌の推移を示す。この 98% の株が Hib 株であり、急速に BLNAR が増加し、逆相関のかたちで感性菌 (BLNAS) が減少してきている。PFGE 解析により菌の相同性を比較すると、その多くが近似の DNA パターンを示し、起原を同じくする Hib 株が全国へと短期間に拡散したことが示唆される^{7~10)}。発症年齢は低年齢化し、1 歳未満が 70% を占めていた。

図 5 には、2006~2007 年にかけて、全国規模で収集した侵襲性感染症由来株の ABPC と CTX の感受性成績と遺伝子変異との関係を示す。遺伝子変異を有する BLNAR は BLNAS とは離れて耐性側に明らかなグループを形成しているが、感受性低下はセフェム系薬のほうが明らかである。Hib に

よる重症感染症では耐性菌を考慮した治療薬の選択が必要であることが示されているが、 β -ラクタマーゼ産生能を有する PBP 変異株 (BLPACR-II) が増加傾向にあることにも注意が必要である。

図 6 にはインフルエンザ菌に対する主な抗菌薬の感受性累積分布を示す。治療上留意しなければならないこととして、インフルエンザ菌に対する CTX や CTRX などのセフェム系薬の作用は、一見 MIC が良好にみえるが、本菌の特性として溶菌に時間がかかる。その理由は、MIC 前後のセフェム系薬やペニシリン系薬を作用させても、菌は隔壁合成のみが阻害されてフィラメント状を呈するのみであり、その状態では菌は死滅しておらず、薬剤が除去されると容易に元の桿菌へと戻ることができるという特性による。

BLNAR による化膿性髄膜炎の場合には、その耐性レベルによっては作用標的がそれぞれ異なるセフェム系薬とカルバペネム系薬の併用が必要となる。また、図には示していないが、MIC が優れているという理由で PIPC を選択する際には、必ず β -ラクタマーゼ産生菌でないことを確認したい。

このような Hib による侵襲性感染症を防ぐ唯一の対策は Hib ワクチンの接種であり、一刻も早い接種の開始が期待される¹¹⁾。

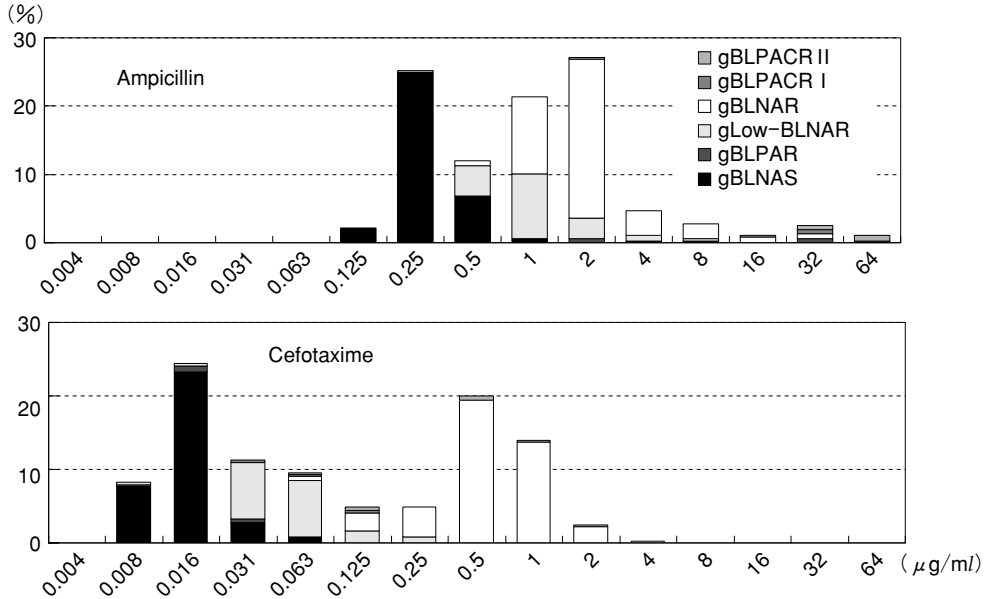


図 5 小児肺炎由来インフルエンザ菌 (2006 年, n=365)

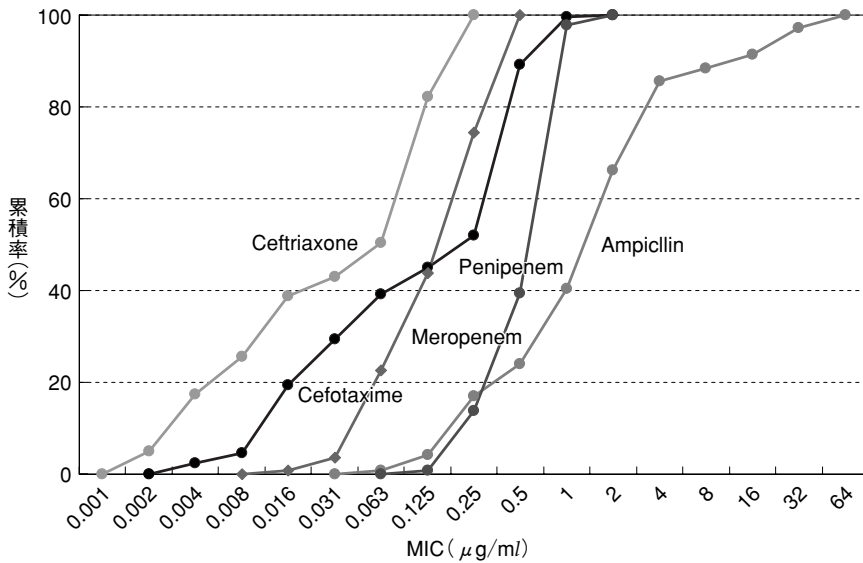


図 6 インフルエンザ菌に対する注射薬の感受性累積分布

IV. 肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*)

ML 耐性マイコプラズマを小児例から初めて分離したのは岡崎ら¹²⁾であるが、同時期に筆者らの研究室ではマイコプラズマを含む網羅的迅速診断法

の構築を行っており、その精査のために本菌の培養も行っていた¹³⁾。本菌は呼吸器感染症の重要な原因菌でありながら、分離培養は診断に役立たないためほとんど実施されなくなっているのが現状であるが、ML の広範な使用は、いつか耐性マイコプラズマを選択するであろうと予測していた。

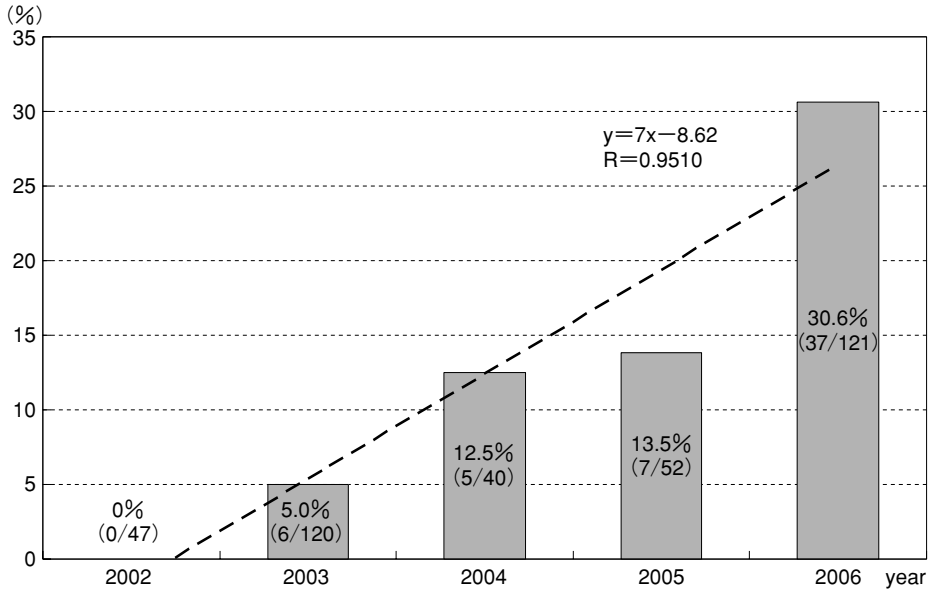


図 7 小児の肺炎例から分離されたマクロライド耐性マイコプラズマの経年的推移

足掛け7年にわたり、小児肺炎例を対象としてPCRによるマイコプラズマ陽性例から菌の分離を行っているが、肺炎例の15~20%がPCR法でマイコプラズマ陽性反応を示し、そのうちの約75%前後から菌そのものを分離している¹⁴⁾。

図7には2002年からの小児肺炎例におけるML耐性マイコプラズマの年次推移を示すが、急速に耐性菌が増加してきていることが示されている¹⁵⁾。これらの症例は一次診療所において抗菌薬が投与され、解熱しないか、あるいは咳嗽が続くなどの臨床所見から病院受診をしており、必ずしもこの耐性率がそのまま一次診療機関の成績にあてはまるわけではないが、耐性菌が増加してきていることは事実であろう。

図8には、今までに分離した380株のマイコプラズマに対するAZMの感受性成績を示すが、耐性菌の感受性は16 μ g/ml以上と明らかな耐性である。ここには示していないEM, CAM, TEL, JMなども同様の耐性パターンを示す。この耐性化には、図示したリボソームを構成する23S rRNAのドメインVのアデニン2063がグアニンへ置換、あるいはアデニン2064がグアニンへ置換したことによって生じている¹⁶⁾。

マイコプラズマ感染症は自然治癒傾向が強いと

いわれるが、耐性マイコプラズマ感染症ではML系薬を投与しても臨床症状が遷延化する例が有意に多く、抗菌薬をMINOなどに変更せざるを得ない例が増えているとされる。耐性マイコプラズマの場合には、治療薬として適切な抗菌薬が少なく、今後いずれの治療法が最適であるのか検討が必要であろう。

V. A群溶血性レンサ球菌 (GAS) と B群溶血性レンサ球菌 (GBS)

GASおよびGBSにおいては、ペニシリン耐性菌は存在せず、また耐性菌も出現しないのではないかと考えられてきた。表2に示すように、確かに両菌種ともペニシリン系薬に明らかな耐性を示す菌株は分離されていないが、GBSではごくわずかではあるものの肺炎球菌のPBP2Xの遺伝子に相当する遺伝子に変異を有する菌株が出現し始めている。ペニシリン系薬には試験管で2~3管程度の感受性低下であるが、セフェム系注射薬には感受性が明らかに低下してきているので、GBSによる化膿性髄膜炎などにおいては今後注意を払わなければならないと考える。また、GASにおいても今後このような耐性菌が出現してくる可能性は十分に考えられる。

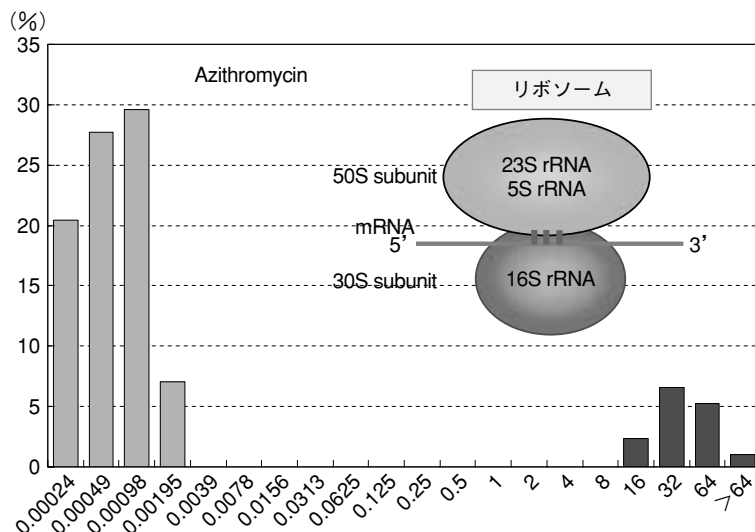


図 8 マイコプラズマのマクロライド薬感受性 (n=380)
EM, CAM, TEL などにも同様の感受性パターンを示す。

表 2 GAS と GBS の各種抗菌薬感受性

抗菌薬	GAS		GBS	
	MIC range	MIC ₉₀	MIC range	MIC ₉₀
ampicillin	0.008~0.031	0.031	0.031~0.25	0.125
amoxicillin				
cefdirinir	0.002~0.016	0.016	0.016~0.125	0.063
cefditoren		0.008	0.016~0.063	0.031
cefazolin	0.063~0.125	0.125	0.063~0.5	0.25
cefotiam	0.031~0.125	0.063	0.125~2	0.5
cefotaxime	0.004~0.031	0.016	0.016~0.125	0.063
panipenem	0.002~0.008	0.008	0.008~0.031	0.031
meropenem	0.002~0.016	0.008	0.031~0.125	0.063
vancomycin	0.25~1	0.5	0.25~0.5	0.5

一方、ML 耐性であるが、これらの耐性化には菌種を越えて共通している耐性遺伝子がかかわっている。すなわち、高度耐性化には ML を修飾(ジメチル化)して耐性化する *erm*(A) あるいは *erm*(B) 遺伝子、軽度耐性化には ML を排出する機構の *mef*(A) 遺伝子が関与している。これらの耐性菌は全分離株の 15% 前後であるが、2000 年代の初期には耐性菌は 2~3% であったことを思うと、漸増傾向にあることが示唆される。

まとめ

抗菌薬の登場から 60 年近い年月における耐性菌

出現と薬剤との関係を見ると、新たに開発された新規骨格を有する抗菌薬であっても、その出現の時期が早いか遅いかは別として、いつかは必ず耐性菌が出現してくるととらえることができる。なぜなら、菌の分裂速度が速い大腸菌から遅い結核菌までさまざまではあるが、それらの宿主であるヒトの世代交代に較べれば比喩ものにならない増殖スピードであることによる。つまり、ある系統の薬剤の使用量が短期間で爆発的に増加すると、菌のポピュレーション中に含まれる耐性菌は選択されやすいことになる。ニューキノロン系薬耐性肺炎球菌や VRE については、わが国よりもその

使用頻度が高かった欧米において先に出現したのはこのことを物語っている。

優れた抗菌薬を長期にわたって使うためには、原因細菌を特定した後に最適な抗菌薬を適切な期間使用することにつぎる。しかし、実行しようとなると、なかなか難しいことも事実である。適切な抗菌薬療法を普及させるため、小児科、耳鼻咽喉科をはじめとして各種ガイドラインが作成されている。

その一方、検査の現場においては、ルーチンに使用可能な PCR 法が構築されつつある。筆者らは短時間にしかも網羅的に原因微生物を検索できる real-time PCR 法を構築した。上咽頭拭い液、鼓膜穿刺液、喀痰、胸水、閉鎖性膿汁、髄液などの検査材料に用いることが可能で、①肺炎球菌、②インフルエンザ菌、③マイコプラズマ、④ GAS を含むβ溶血性レンサ球菌、⑤ *Chlamydomphila pneumoniae*、⑥ *Legionella pneumophila* が検索対象菌種となっている¹⁷⁾。

この方法に 1 ステップ加わるが、呼吸器系ウイルスの 12 種類を同時に検索することも可能である。アデノウイルス (AdV)、インフルエンザ (Flu) A, B, RSV、パラインフルエンザウイルス (PIV) 1, 2, 3, ライノ (RV)、エンテロ (EV)、コロナ (CoV) ウイルス、そして比較的最近発見されたヒューマンメタニューモウイルス (hMPV)、ヒューマンボカウイルス (HBoV) である。

細菌とウイルスを同時検索することにより、原因微生物の推定ができるようになると、診断においても、また抗菌薬適正使用のうえでもそのメリットは大きいと考える¹⁸⁾。

文 献

- 1) 紺野昌俊：抗菌薬の開発と薬剤耐性菌の歴史。日本臨床微生物学雑誌 14 : 1-23, 2004
- 2) Ubukata, K : Problems associated with high prevalence of multidrug-resistant bacteria in patients with community-acquired infections. J Infect Chemother 9 : 285-291, 2003
- 3) 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。日治療誌 54 : 69-94, 2006
- 4) 紺野昌俊, 生方公子編：改定ペニシリン耐性肺炎球菌。協和企画通信, 東京, 1999
- 5) Ubukata K, Muraki T, Igarashi A, et al : Identification of penicillin and other β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* by PCR. J Infect Chemother 3 : 190-197, 1997
- 6) Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, et al : Association of amino acid substitution in penicillin-binding protein 3 with β -lactam resistance in β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 45 : 1693-1699, 2001
- 7) Hasegawa K, et al : Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. Microbial Drug Resistance 9 : 39-46, 2003
- 8) Hasegawa K, Chiba N, Kobayashi R, et al : Rapidly increasing prevalence of β -lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in meningitis. Antimicrob Agents Chemother 48 : 1509-1514, 2004
- 9) 長谷川恵子, 千葉菜穂子, 小林玲子, 他 : 化膿性髄膜炎例から分離された *Haemophilus influenzae* の疫学解析—1999 年から 2003 年の分離株について—。感染症学雑誌 78 : 835-845, 2004
- 10) Hasegawa K, Kobayashi R, Nakayama E, et al : High prevalence of type b β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in meningitis : the situation in Japan where Hib vaccine has not been introduced. J Antimicrob Chemother 57 : 1077-1082, 2006
- 11) 岩田 敏 : 肺炎球菌およびインフルエンザ菌感染症に対するワクチン接種の意義と今後の展望。日本臨床微生物学雑誌 18 : 1-7, 2008
- 12) Okazaki N, Narita M, Yamada S, et al : Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin *in vitro*. Microbiol Immunol 45 : 617-620, 2001
- 13) Morozumi M, Hasegawa K, Chiba N, et al : Application of PCR for *Mycoplasma pneumoniae* detection in children with community-acquired pneumonia. J Infect Chemother 10 : 274-279, 2004
- 14) Morozumi M, Ito A, Murayama SY, et al : Assessment of real-time PCR for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in pediatric patients. Can J Microbiol 52 : 125-129, 2005
- 15) Morozumi M, Hasegawa K, Kobayashi R, et al :

- Emergence of macrolides-resistant *Mycoplasma pneumoniae* with a 23S rRNA gene mutation. Antimicrob Agents Chemother 49 : 2302-2306, 2005
- 16) Morozumi M, Iwata S, Hasegawa K, et al : Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in pediatric patients with community-acquired pneumonia. Antimicrob Agents Chemother 52 : 348-350, 2008
- 17) Morozumi M, Nakayama E, Iwata S, et al : Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes. J Clin Microbiol 44 : 1440-1446, 2006
- 18) Nakayama E, Hasegawa K, Morozumi M, et al : Rapid optimization of antimicrobial chemotherapy given to pediatric patients with community-acquired pneumonia using PCR techniques with serology and standard culture. J Infect Chemther 13 : 305-313, 2007

*

*

*