

[短 報]

当院における ampicillin 耐性 *Haemophilus influenzae* の検出状況と薬剤感受性について

福岡史奈・宮本仁志・村上 忍・森本麻里・田中友理・西宮達也

愛媛大学医学部附属病院検査部

(平成 26 年 3 月 20 日受付, 平成 26 年 6 月 26 日受理)

愛媛大学医学部附属病院 検査部において分離した *Haemophilus influenzae* を対象に ampicillin (ABPC) 耐性菌検出状況の比較 (2002 年, 2011 年~2012 年),  $\beta$ -lactamase 産生菌検出率の変化 (1995 年~2013 年), および近年の薬剤感受性傾向 (2011 年~2012 年) について検討を行った。2011 年~2012 年の耐性菌検出状況は, 2002 年と比較すると  $\beta$ -lactamase producing amoxicillin/clavulanic acid resistant (BLPACR-II) および  $\beta$ -lactamase nonproducing ampicillin resistant (BLNAR) はどちらも 10% 程度増加し, Low-BLNAR,  $\beta$ -lactamase nonproducing ampicillin susceptible (BLNAS),  $\beta$ -lactamase producing ampicillin resistant (BLPAR) はそれぞれ 10%, 5%, 3% 程度減少していた。特に, 入院・外来患者由来の内訳に注目すると, 入院患者由来株では BLNAR, 外来患者由来株では BLPACR-II が著増していた。一方,  $\beta$ -lactamase 産生菌検出率は 1995 年以降増加傾向にあり, 1997 年をピークに減少傾向に転じていたが, 2009 年以降再び増加していた。ABPC に感性を示す *H. influenzae* は全体の半数程度であり, sulbactam/ampicillin には全体の約 80% が感性を示した。また, tazobactam/piperacillin, ceftriaxone, meropenem に対しては全株感性を示し, 治療薬としての有用性が示唆された。Levofloxacin および ciprofloxacin については良好な感受性結果を得られたが, 耐性株を 2 株認めた。

**Key words:** *Haemophilus influenzae*, *ftsI* 遺伝子変異,  $\beta$ -lactamase 産生菌

序 文

本邦において, 従来問題となってきた ampicillin (ABPC) 耐性 *Haemophilus influenzae* は,  $\beta$ -lactamase 産生により耐性を示す  $\beta$ -lactamase producing ampicillin resistant (BLPAR) であった<sup>1)</sup>。しかし, 2000 年以降, セフェム系薬の使用増加に伴い,  $\beta$ -lactamase 非産生の  $\beta$ -lactamase nonproducing ampicillin resistant (BLNAR) が急速に増加してきた<sup>2)</sup>。BLNAR は penicillin binding protein (PBP) 3 をコードする *ftsI* 遺伝子の変異し, PBP3 の構造変化により  $\beta$ -ラクタム系薬に耐性を示す<sup>1)</sup>。この耐性タイプは *ftsI* 遺伝子上

に Asn526Lys 変異のみ有する low-BLNAR, および Asn526Lys と Ser385Thr 変異を有し low-BLNAR よりセフェム系薬の感受性が低下した BLNAR の 2 タイプに分けられる。近年はさらに  $\beta$ -lactamase を産生し, *ftsI* 遺伝子変異も併せ持つ  $\beta$ -lactamase producing amoxicillin/clavulanic acid resistant (BLPACR) の分離例も増加している<sup>3)</sup>。BLPACR も *ftsI* 遺伝子の変異部位に基づき, Asn526Lys 変異のみ有する BLPACR-I, および Asn526Lys と Ser385Thr 変異を有する BLPACR-II の 2 タイプ存在する。このように, *H. influenzae* の  $\beta$ -ラクタム系薬に対する耐性機序はさらに複雑化しており, 耐性菌分離状況や薬剤感受性の動向に留意する必要がある。

今回, 我々は臨床材料より分離した *H. influenzae* について ABPC 耐性菌検出状況,  $\beta$ -lactamase 産生菌検出率の変化, および近年の薬剤感受性傾向について検討したので報告する。

著者連絡先: (〒791-0295) 愛媛県東温市志津川  
愛媛大学医学部附属病院検査部  
福岡史奈  
TEL: 089-960-5621  
FAX: 089-960-5627  
E-mail: 37-fkokb@m.ehime-u.ac.jp

## I. 材料と方法

対象は当院細菌検査室において各種臨床材料より分離した *H. influenzae* である。

なお、一患者につき初回に分離された1株のみを対象とした。

### 1) ABPC 耐性菌検出

2011年～2012年に分離した87株（入院患者由来：36株，外来患者由来：51株），および10年前の成績と比較するため2002年に分離した51株（入院患者由来：27株，外来患者由来：24株）を用いた。菌株は、「菌株保存用バイアル マイクロバンク（イワキ）」を使用し，凍結保存（-80℃）したものをを用い，チョコレート寒天培地（極東製薬）にて37℃24時間CO<sub>2</sub>培養して復元させた。その後，「インフルエンザ菌 遺伝子検出試薬（湧永製薬）」を用い，添付文書に従いPCR法によりTEM遺伝子および *ftsI* 遺伝子変異 (*pbp3-1*, *pbp3-2*) の検出を行った。PCR反応後，増幅産物を2%アガロースゲルで電気泳動し，紫外線照射下でバンドを確認した。なお，TEM遺伝子および *ftsI* 遺伝子変異の有無によりβ-lactamase non-producing ampicillin susceptible (BLNAS), Low-BLNAR, BLNAR, BLPAR, BLPACR-I, および BLPACR-II の6タイプ<sup>1)</sup>に分類した。

### 2) β-lactamase 産生菌検出

1995年～2013年までに分離された833株について，各々臨床分離時に「IDテスト・HN-20ラピッド（日水製薬）」を用い，ニトロセフィン法によるβ-lactamaseの検出を行った。なお，1995年から2013年までの年ごとにおける対象菌株の内訳は，38, 47, 33, 52, 35, 34, 37, 51, 45, 56, 57, 55, 49, 47, 38, 35, 52, 35, および37であった。

### 3) 薬剤感受性検査

2011年～2012年の分離株は87株であったが，薬剤感受性プレートに発育を認めなかった2株を除外し，残りの85株を用いた。薬剤感受性検査は「ストレプト・ヘモ サプリメント ‘栄研’（栄研化学）」添加「ミューラーヒントンプイヨン ‘栄研’（栄研化学）」および「ドライプレート ‘栄研’（栄研化学）」を使用し，Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の勧告に従い微量液体希釈法によりMICを測定した。対象薬剤はABPC, sulbactam/ampicillin (S/A), tazobactam/piperacillin (T/P), ceftriaxone (CTRX), meropenem (MEPM), levofloxacin (LVFX), ciprofloxacin (CPF) の7薬剤とした。各薬剤のブレイクポイント（カッコ内は感性，耐性：μg/mL）は，ABPC (≤1, ≥4), S/A (≤2, ≥4), T/P (≤1, ≥2), CTRX

(≤2, >2), MEPM (≤0.5, ≥1), LVFX (≤2, ≥4), CPF (≤1, ≥2) である。

## II. 結果

### 1) ABPC 耐性菌検出状況

2002年および2011年～2012年における耐性菌の割合を全株，入院患者由来株および外来患者由来株別に図1に示した。2002年と比較すると，全株についてはBLPACR-II 10.7% およびBLNAR 11.5% の増加が認められ，BLPAR 2.8%, low-BLNAR 13.4%, BLNAS 6.0% の減少が認められた。入院・外来患者由来株について2002年と比較すると，両由来株ともBLPACR-II およびBLNARが増加していたが，入院患者由来株ではBLNAR 19.4%，外来患者由来株ではBLPACR-II 13.7% の著しい増加が認められた。

### 2) β-lactamase 産生菌検出率

図2に示すようにβ-lactamase産生菌検出率の変化は1995年から1997年にかけて増加傾向にあったが，1997年をピークに減少傾向に転じた。2000年から2008年は0%～6.4%で推移していたが，2009年以降は再び増加傾向が認められ，近年は1997年と同程度の分離頻度であった。

### 3) 薬剤感受性成績

各抗菌薬における薬剤感受性成績を表1に示した。ABPCに対して感性を示したのは全体の52.9%（85株中45株）であった。BLPARおよびBLPACR-IIは全株耐性を示したが，Low-BLNAR全株およびBLNARの49.1%（55株中27株）は感性であった。さらに，S/Aについて感性を示したのは全体の81.2%（85株中69株）であった。BLNAS, BLPAR, Low-BLNARは全株感性であり，BLPACR-IIの45.5%（11株中5株）およびBLNARの81.8%（55株中45株）も感性を示した。一方，T/P, CTRX, MEPMについては全株感性を示した。LVFXおよびCPFは各々2株耐性が認められ，その耐性タイプはBLNARおよびBLPACR-IIであった。

## III. 考察

本邦において，β-lactamaseを産生するBLPARの出現以来，*H. influenzae*の薬剤耐性化により抗菌薬選択に難渋する症例が増えている。特に，2000年ごろから急速に増加しているBLNARは，*ftsI*遺伝子変異によりPBP3の構造が変化し薬剤親和性が低下するため，ABPC以外のβ-ラクタム系薬に対する感受性も低下している<sup>1)</sup>。さらに，近年は両者の耐性機構を併せ持つBLPACRも増加傾向にあり<sup>3)</sup>，薬剤耐性菌

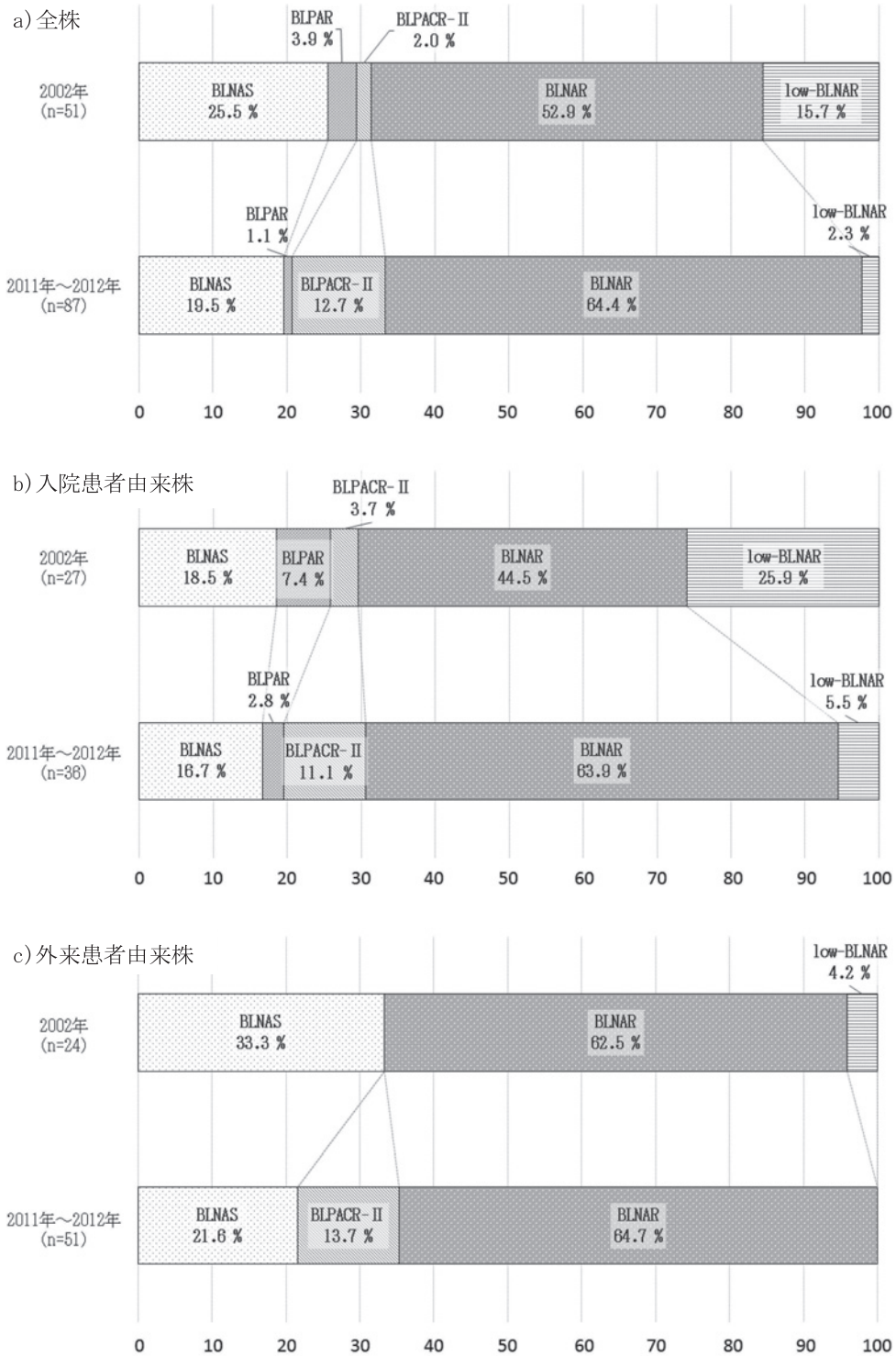


図1. ABPC 耐性菌検出状況 (2002年, 2011年~2012年)

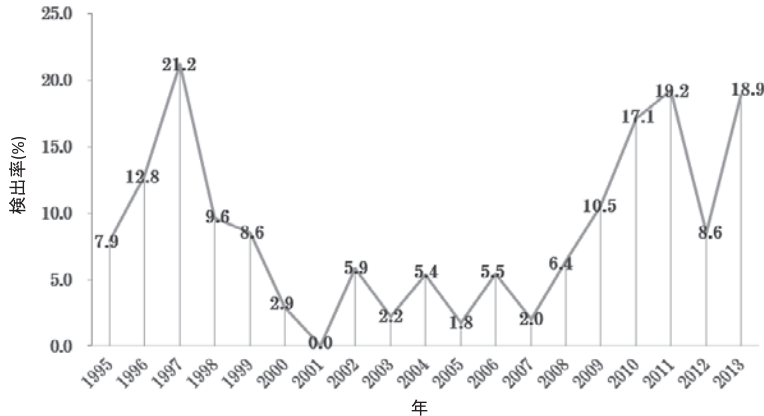


図2.  $\beta$ -lactamase 産生菌検出率の変化 (1995年～2013年)

の拡大が懸念されている。

近年における *H. influenzae* の耐性菌検出状況について、星野らは、BLNARが有意な増加傾向にあり、BLPACRは微増傾向であったと報告した<sup>3)</sup>が、我々の成績では、近年は2002年に比べBLPACR-IIおよびBLNARがそれぞれ10%程度増加していた。特に、入院患者由来株はBLNARが著増、BLPACR-IIも増加傾向にある一方、外来患者由来株はBLNARがわずかに増加、BLPACR-IIは著増しており、市中におけるBLPACR-IIの蔓延が示唆された。この検出状況については報告者による差が認められており<sup>23)</sup>、耐性菌検出状況を把握するためには、今後、全国規模のサーベイランス調査が必要であると考えられる。

一方、 $\beta$ -lactamase 産生菌検出率は調査を開始した1995年以降増加傾向にあったが、1997年をピークに減少傾向に転じていた。これは、*H. influenzae* 感染症の治療薬として主に $\beta$ -ラクタム系薬が使用されていた1990年代に $\beta$ -lactamase 産生菌が増加し、耐性菌増加に伴い $\beta$ -lactamase 阻害薬やセフェム系薬が使用されるにつれ減少したと考えられたが、2009年以降は再び増加傾向が認められた。2012年は一時的に減少していたが、2013年は2011年と同程度の検出率であったことを考慮すると、何らかの原因で減少したと推察される。上述したように、この10年間でBLPARは減少しBLPACR-IIが増加していたことから、2009年以降の $\beta$ -lactamase 産生菌増加はBLPACR-IIの増加が起因していると考えられる。BLPACR-IIは $\beta$ -lactamase 産生と *ftsI* 遺伝子変異を併せ持つため、その出現については、BLPARがセフェム系薬などの治療薬により *ftsI* 遺伝子が誘導された<sup>5)</sup>可能性やBLNARがプラスミドを介して $\beta$ -lactamase

産生能を獲得した<sup>6)</sup>可能性が示唆された。

本研究において、近年、ABPCに感性を示す *H. influenzae* は全体の半数程度であった。耐性タイプ別ではABPCに対してlow-BLNARが全株感性を示し、BLNARも約半数は感性を示した。BLPARおよびBLPACR-IIは全株耐性を示し、ABPCによる治療効果は期待できない結果であった。さらに、 $\beta$ -lactamase 阻害薬との合剤であるS/Aに対しては全体の約80%が感性であった。BLPARおよびLow-BLNARは全株感性を示したものの、PBP3構造変化のあるBLNARの20%程度およびBLPACR-IIの約半数は耐性を示した。一方、同じ $\beta$ -ラクタム系薬であるT/P、CTRX、MEPMについては全株感性を示し、治療薬としての有用性が示唆された。PIPCはPBP3に加えPBP2に対しても結合親和性を有し、ペニシリン系薬の中で唯一BLNARにも良好な感受性を示す<sup>7)</sup>ため、 $\beta$ -lactamase 阻害薬との合剤でもあるT/Pの感受性は良好であったと考えられる。セフェム系薬に関してはPBP3をコードする *ftsI* 遺伝子変異に伴い、感受性が低下する<sup>4)</sup>といわれているが、本研究においてCTRXのMICは全耐性タイプで低値であった。セフェム系薬は薬剤によりPBP3との結合親和性に違いがあるうえ、同じセフェム系薬の中でもCTRXの耐性化頻度およびMIC上昇倍率は低いといわれている<sup>8)</sup>。そのためBLNARやBLPACRにおいても感受性の低下が認められなかったと推察される。一方、MEPMは他のカルバペネム系薬に比べPBP3AおよびPBP3Bに対する結合親和性が高く、そのためMICが低い<sup>9)</sup>といわれており、本研究でもそれを裏付ける結果が得られた。今回、ニューキノロン系薬2薬剤(LVFX, CPFX)においてBLNAR 1株およびBLPACR-II 1株で耐性

表 1. 薬剤感受性成績

ABPC	MIC (μg/mL)						MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
	≤0.25	0.5	1	2	4	>4		
BLNAS		15	1				0.5	0.5
low-BLNAR	1		1				≤0.25	1
BLNAR		5	22	18	9	1	2	4
BLPAR					1		4	4
BLPACR-II						11	>4	>4
Total	1	20	24	18	10	12		
S/A	MIC (μg/mL)						MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
	≤0.25	0.5	1	2	4	>4		
BLNAS		15	1				0.5	0.5
low-BLNAR	1		1				≤0.25	1
BLNAR	1	4	24	16	10		1	4
BLPAR		1					1	1
BLPACR-II				5	5	1	4	4
Total	2	20	26	21	15	1		
T/P	MIC (μg/mL)						MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
	≤0.25	0.5	1	2	4	>4		
BLNAS	16						≤0.25	≤0.25
low-BLNAR	2						≤0.25	≤0.25
BLNAR	55						≤0.25	≤0.25
BLPAR	1						≤0.25	≤0.25
BLPACR-II	11						≤0.25	≤0.25
Total	85	0	0	0	0	0		
CTRX	MIC (μg/mL)						MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
	≤0.12	0.25	0.5	1	2	>2		
BLNAS	16						≤0.12	≤0.12
low-BLNAR	2						≤0.12	≤0.12
BLNAR	32	23					≤0.12	0.25
BLPAR	1						≤0.12	≤0.12
BLPACR-II	7	4					≤0.12	0.25
Total	58	27	0	0	0	0		
MEPM	MIC (μg/mL)						MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
	≤0.06	0.12	0.25	0.5	1	>1		
BLNAS	14	1	1				≤0.06	0.12
low-BLNAR	1	1					≤0.06	0.12
BLNAR	23	14	15	3			0.12	0.25
BLPAR	1						≤0.06	≤0.06
BLPACR-II	3	4	3	1			0.12	0.25
Total	42	20	19	4	0	0		
LVFX	MIC (μg/mL)						MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
	≤0.25	0.5	1	2	4	>4		
BLNAS	16						≤0.25	≤0.25
low-BLNAR	2						≤0.25	≤0.25
BLNAR	53		1			1	≤0.25	≤0.25
BLPAR	1						≤0.25	≤0.25
BLPACR-II	10				1		≤0.25	≤0.25
Total	82	0	1	0	1	1		
CPFV	MIC (μg/mL)						MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
	≤0.25	0.5	1	2	4	>4		
BLNAS	16						≤0.25	≤0.25
low-BLNAR	2						≤0.25	≤0.25
BLNAR	53		1			1	≤0.25	≤0.25
BLPAR	1						≤0.25	≤0.25
BLPACR-II	10					1	≤0.25	≤0.25
Total	82	0	1	0	0	2		

ABPC : ampicillin, S/A : sulbactam/ampicillin, T/P : tazobactam/piperacillin, CTRX : ceftriaxone, MEPM : meropenem, LVFX : levofloxacin, CPFV : ciprofloxacin

が認められた。ニューキノロン系薬は市中感染症の中心的治療薬として使用されており、*H. influenzae* においても薬剤耐性菌の増加に伴いその重要性が増している。しかし、近年は国内においてニューキノロン系薬に耐性を示す *H. influenzae* の分離例が報告されており<sup>10)</sup>、当院でも 2011 年に初めて耐性菌が 1 株分離された。さらに 2012 年にも 1 株分離されたことから、今後の耐性菌増加が懸念される。

ABPC 耐性 *H. influenzae* について、この 10 年間で各タイプの分離頻度は大きく変化し、BLNAR や BLPACR-II が増加していた。また、薬剤感受性成績より T/P, CTRX, および MEPM は治療薬としての有効性が示唆されたが、2010 年以前には認められなかったニューキノロン系薬 (LVFX, CPF) 耐性菌が検出された。今回の検討結果より *H. influenzae* の耐性菌分離状況や薬剤感受性は時代とともに変化していることが推測されたため、今後もその動向に注目していきたい。

本論文の趣旨は、第 46 回中四国支部検査医学学会 (2013 年 11 月) にて発表した。

**利益相反：** 申告すべき利益相反なし

## 文 献

- 1) 生方公子, 千葉菜穂子, 小林玲子, 他. 2002. 本邦において 1998 年から 2000 年の間に分離された *Haemophilus influenzae* の分子疫学解析. 日本化学療法学会雑誌 50: 794-804.
- 2) 坂田 宏. 2009. 小児臨床分離 *Haemophilus influenzae* の静注用抗菌薬に対する薬剤感受性. 日本化学療法学会雑誌 57: 434-437.
- 3) 星野 直, 朽名 悟, 澤田恭子, 他. 2013. 千葉県こども病院における 2009 年から 2012 年の小児臨床検体由来 *Haemophilus influenzae* の抗菌薬感受性に関する検討. 感染症学雑誌 87: 581-589.
- 4) Ubukata, K., Y Shibasaki, K Yamamoto, et al. 2001. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with  $\beta$ -lactam resistance in  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 45: 1693-1699.
- 5) 長谷川恵子, 千葉菜穂子, 小林玲子, 他. 2004. 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.
- 6) 松本歩美, 細矢光亮, 片寄雅彦, 他. 2005. 分子遺伝学的にみた小児における耐性インフルエンザ菌保有の危険因子に関する検討. 感染症学雑誌 79: 249-253.
- 7) 須藤扶佐代, 石和田稔彦, 星野 直, 他. 2005. 小児 *Haemophilus influenzae* 気管支肺感染症に対する piperacillin, tazobactam/piperacillin の臨床効果に関する検討. 感染症学雑誌 79: 637-643.
- 8) 小林寅喆, 金山明子, 瀧川元子, 他. 2010. *Streptococcus pneumoniae* および *Haemophilus influenzae* の  $\beta$ -lactam 薬に対する *in vitro* における耐性獲得に関する検討. 日本化学療法学会雑誌 58: 451-459.
- 9) 山口恵三, 石井良和, 岩田守弘, 他. 2004. Meropenem を含む各種注射用抗菌薬に対する 2002 年臨床分離株の感受性サーベイランス. Jpn. J. antibiotics 57: 70-104.
- 10) Hirakata, Y., K Ohmori, M Mikuriya, et al. 2009. Antimicrobial activities of piperacillin-tazobactam against *Haemophilus influenzae* isolates, including  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant and  $\beta$ -lactamase-positive amoxicillin-clavulanate-resistant isolates, and mutations in their quinolone resistance-determining regions. Antimicrob. Agents 53: 4225-4230.

The state of isolation and antimicrobial susceptibility of ampicillin resistant  
*Haemophilus influenzae* detected in our hospital

Mina Fukuoka, Hitoshi Miyamoto, Shinobu Murakami, Mari Morimoto, Yuri Tanaka, Tatsuya Nishimiya  
Department of Clinical Laboratory, Ehime University Hospital

We studied three things regarding *Haemophilus influenzae* that was isolated at Ehime University Hospital, (1) a comparison of the state that ampicillin resistant strains were detected, (2) an alteration of the isolating rate about strains that produce  $\beta$ -lactamase, and (3) the latest antimicrobial susceptibility. As for (1),  $\beta$ -lactamase producing amoxicillin/clavulanic acid resistant (BLPACR-II) and  $\beta$ -lactamase nonproducing ampicillin resistant (BLNAR) increased about 10%, Low-BLNAR,  $\beta$ -lactamase nonproducing ampicillin resistant (BLNAS) and  $\beta$ -lactamase producing ampicillin resistant (BLPAR) each decreased 10, 5, 3%. Especially, the increase was remarkable for BLNAR derived from inpatients and BLPACR-II derived from outpatients. As regards (2), the isolating rate had increased 1995 to 1997, and after it reached the peak in 1997, had decreased for few years. But in recent years, it showed an increasing tendency again. From (3), while ampicillin was effective in half of all strains and sulbactam/ampicillin was in 80%, the sensitivity of tazobactam/piperacillin, ceftriaxone and meropenem was doing very well. It suggested that these three drugs are effective as curative. MICs of levofloxacin and ciprofloxacin were low readings, but we observed that two strains were so tolerant.