

ペニシリン耐性肺炎球菌の臨床分離株における薬剤耐性機構について

—ペニシリン結合蛋白と PBP 2 B 遺伝子の解析—

生方 公子・杉 浦 睦・紺野 昌俊

帝京大学医学部臨床病理*

大 成 滋

広島済生会病院小児科

山 根 明 男

湧永製薬株式会社

(平成 6 年 7 月 21 日受付・平成 6 年 8 月 8 日受理)

1993 年に臨床検査材料から分離された 30 株の肺炎球菌を用いて、 β -ラクタム系薬の感受性、ペニシリン結合蛋白 (PBPs) の親和性、PCR による PBP 2 B 遺伝子の検索を行い、以下の成績を得た。

1) これらの菌株の中には、penicillin G (PCG) に対する MIC が $\geq 0.125 \mu\text{g/ml}$ で、ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) と判定された株が 15 株認められた。

2) PRSP の oxacillin (MIPIC), ampicillin (ABPC), cefotaxime (CTX), cefdinir (CFDN) および imipenem (IPM) に対する MIC は、ペニシリン感性肺炎球菌 (PSSP) に対するそれとは明らかに異なっていた。

3) PRSP と PSSP の識別を行うために、それらの PBP 2 B 遺伝子の一部を増幅するための 3 種類のプライマーを作成して PCR を行った。PCG の MIC が $< 0.125 \mu\text{g/ml}$ の菌株では、感性菌検出用のプライマーで DNA が増幅された。一方、PRSP 検出用のプライマーで DNA が増幅された株は、すべて PCG の MIC が $\geq 0.125 \mu\text{g/ml}$ であった。その内訳は、class A が 1 株、class B が 10 株であった。PRSP であるにもかかわらず、PSSP 用のプライマーで DNA が増幅された菌株が 4 株認められた。

4) PRSP では PBP 2 B に対する $[^3\text{H}]$ -PCG の親和性が低下しており、それに加えて 1 A や 1 B の親和性も低下している株が多かった。一方、PSSP の中でも 1 A や 1 B に対する親和性が低下している株、あるいは 2 X が新たに出現している株が認められた。

以上の成績から、本邦における PRSP には class B に属する PRSP が多く、class A の PRSP は少ないことが推定されたが、今までの報告にはない PBP 2 B 遺伝子の変異株もあることが示唆された。

Key words: 肺炎球菌, ペニシリン耐性, ペニシリン結合蛋白, PBP 2 B 遺伝子

近年、我が国においてもペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) が増加しつつある^{1,2)}。特に、小児や^{1,3,4)}や成人⁵⁾の化膿性髄膜炎、あるいは中耳炎^{6,7)}から分離され始めたことが注目される。これらの症例では ABPC が無効で、なかには PRSP の治療薬として欧米で推奨されてきた cefotaxime (CTX) も無効で、カルバペネム系薬に変更して功を奏した例も報告されている⁴⁾。

肺炎球菌のペニシリン耐性は、penicillin G (PCG) に

対して $\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$ の MIC を示す株を明らかな PRSP、 $0.125 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ の MIC を示す菌を軽度耐性の PRSP として区別している⁸⁾が、PRSP における耐性機構は複雑⁹⁾で、ペニシリン感性肺炎球菌 (PSSP) において通常みだされている 5 種類のペニシリン結合蛋白 (PBPs) のうち、PBP 2 B に対する薬剤親和性の低下が見いだされる菌株を中心に、PBP 1 A や PBP 2 A の親和性が低下している株や、2 X と呼ばれる新たな PBP がみいだされる

PRSP等の報告もみられる¹⁰⁻¹²⁾。事実、臨床から分離されるPRSPにおいては、 β -ラクタム系薬の親和性が変化したPBPが複雑に介在している菌株が多いとされている¹³⁻¹⁵⁾。

一方、本邦においては、重野ら⁶⁾が化膿性髄膜炎例から分離したPRSPのPBPsに対する β -ラクタム系薬の親和性を調べ、第三世代セフェム系薬に対する親和性が低下していたと報告しているが、いずれのPBPに対する親和性が低下していたかは定かでない。

我々は、上述したような動向から、我が国で分離され始めたPRSPの疫学調査を行うと同時に、薬剤耐性機構についても明らかにする必要性を感じた。

本論文においては、その疫学調査の端緒として、我々が収集している肺炎球菌の中から30株を抽出して、i) β -ラクタム系薬に対する感受性、ii) PBPsに対する β -ラクタム系薬の親和性、iii) PCRによるPBP 2 B遺伝子の検索について行った成績を述べる。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

実験に用いた菌株は、1993年2月から4月までの期間に、帝京大学医学部付属病院において各種の検査材料から分離された肺炎球菌中の28株と、広島済生会病院において小児の化膿性髄膜炎から分離された肺炎球菌2株である。これらの菌株については、オプトヒン感受性試験、イヌリン分解試験、および胆汁溶解試験を実施した。あわせて、API-20 STREPによりその性状を調べ、APIコードでも肺炎球菌であることを確認した。

2. 薬剤感受性

被験菌の各種 β -ラクタム系薬に対する感受性は、日本化学療法学会の標準法¹⁶⁾に従って測定した。培地はミューラーヒントン寒天培地(栄研)を用い、綿羊の脱線維血液を5%の割合に加えて使用した。感受性を測定した抗菌薬は、penicillin G (PCG; 萬有製薬株式会社)、oxacillin (MPIPC; 萬有製薬株式会社)、ampicillin (ABPC; 明治製菓株式会社)、imipenem (IPM; 萬有製薬株式会社)、cefotaxime (CTX; ヘキストジャパン株式会社)、cefdinir (CFDN; 藤沢薬品工業株式会社)の6薬剤である。それぞれの薬剤は、力価の明らかな純末を各会社から分与を受け、実験に供した。

3. PBPsに対する β -ラクタム系薬の親和性の検討

それぞれの菌株のPBPsに対する β -ラクタム系薬の親和性は、 $[^3\text{H}]$ -PCG (9.25 MBQ) を用いて解析した。

被験菌は50 mlのTodd Hewitt broth (TH broth: Difco) で前培養した後、500 mlのTH broth (Difco) に植え継ぎ、37°Cで6時間培養した。次いで、4°C、10,000 rpmで10分間遠心し、沈渣の菌をPBP緩衝液(pH 7.2)で1回洗浄した後、再び遠心して集菌した。菌体からの膜画分の調整は既法¹⁷⁾に従った。

$[^3\text{H}]$ -PCGと各膜画分との反応は、両者を混合して30°Cで10分間インキュベートした。反応終了後の電気泳動やフルオログラフィーの操作は前述した方法¹⁷⁾に準じた。

4. PCR用プライマー

PSSPとPRSPのPBP 2 B遺伝子検出用のプライマーは、Dowson^{18,19)}によって報告されたPBP 2 B遺伝子の塩基配列の成績にもとづき3種類を作成した。すなわち、①PSSPのPBP 2 B遺伝子の1,490 bpから1,729までの240 bpを増幅できるもの、②PRSPのclass Aと呼ばれるPBP 2 B遺伝子の変異部分の1,515 bpから1,729 bpまでの215 bpを増幅できるもの、③PRSPのclass Bと呼ばれるPBP 2 B遺伝子の変異部分の1,444 bpから1,729 bpまでの286 bpを増幅できるものを作成した。

あわせて、④肺炎球菌に特有なautolysin遺伝子(*lytA*)²⁰⁾の694 bpから966 bpまでの273 bpを増幅できるプライマーを作成した。

これらのプライマーのうち、②と④を含むものをPCR混合液A、①と③を含むものをPCR混合液Bとした。

A) プライマー混合液A

① *Streptococcus pneumoniae* autolysin specific primer

ALY 1: 5' TGAAGCGGATTATCACTGGC

ALY 2: 5' GCTAAACTCCCTGTATCAAGCG

② *S. pneumoniae* PRSP class A primer

P 2 BR 4: 5' CTAGGCCAATGCCGATTACG

P 2 B 4: 5' AGTAGATTCATCTGGTAGGTC

B) プライマー混合液B

① *S. pneumoniae* PRSP class B primer

P 2 BR 3: 5' CCAAACCTTAACAGATCAGC

P 2 B 4: 5' AGTAGATTCATCTGGTAGGTC

② *S. pneumoniae* PSSP primer

P 2 B 3: 5' ATCAATTCTTGGTATACTCAGG

P 2 B 4: 5' AGTAGATTCATCTGGTAGGTC

5. PCRによるPBP遺伝子の検索

血液寒天培地(極東製薬)上に発育した肺炎球菌は、20 μ lの溶菌液²¹⁾をあらかじめ分注したマイクロチューブへ白金耳を用いて1コロニー釣菌した。な

お、PCR 混合液 A と B (それぞれのプライマーミックスに DNA ポリメラーゼ等を加えたもの²¹⁾)用に、1 菌株につき 2 本のマイクロチューブを準備した。チューブは、Gene Amp PCR System 9600-R (日本ロシュ(株))にセットし、60°C、20 分、続いて 90°C、10 分の溶菌操作を行った。次いで、PCR 混合液の A と B とをそれぞれのチューブに別々に 5 μ l ずつ加えた。PCR は、①50°C、30 秒、②70°C、30 秒、③94°C、15 秒の条件下で 30 サイクル行い、反応後の検体は、3% 濃度のアガロースゲル板を用いて電気泳動を行って解析した。

II. 結 果

1. 薬剤感受性と PCR の成績の関係

Fig. 1 には、肺炎球菌 3 株について PCR を行い、その増幅産物をゲル電気泳動した代表的な成績を示す。

PSSP と記してある UB-034 株は、PCG に 0.016 μ g/ml、MIPIC に 0.031 μ g/ml の MIC を示し、薬剤感受性の上から PSSP と判定された株である。A カラムは *lytA* 遺伝子用のプライマーで増幅される DNA 分子量に相当し、B カラムは PSSP の PBP 2 B 検出用プライマーで増幅される分子量に相当した DNA である。以下、このように PCR 上で PSSP と判定される菌株を class S と称することとした。

中央の Class A とした UB-023 株は、PCG に 0.25 μ g/ml、MIPIC に 1.0 μ g/ml の MIC を示し、軽度の PRSP と判定された株である。この菌株では、PCR 混合液 A のみで 2 本の DNA が検出されているが、分子量の大きい上のバンドが *lytA* 遺伝子、下が PBP 2 B の class A 変異を検出するプライマーで増幅された DNA の分子量に一致したバンドである。以下、このような菌株を class A の PRSP と表現することとした。

右側の UB-008 株は、PCG に 4.0 μ g/ml、MIPIC に 8.0 μ g/ml の MIC を示し、明らかな PRSP である。この菌株では PCR 混合液 A で *lytA* 遺伝子に相当する DNA、PCR 混合液 B で PBP 2 B の class B 変異を検出する DNA の分子量に一致したバンドが認められる。以下、この場合には class B の PRSP と称することとした。

各菌株の PCR の成績と、 β -ラクタム系薬感受性との関係を Fig. 2 に示す。薬剤感受性成績の上からの PRSP と PSSP の識別は、NCCLS の勧告⁸⁾に従い、PCG に対して 0.1 μ g/ml 以上の MIC を示す株、あるいは MIPIC に 1.0 μ g/ml 以上の MIC を示す株を PRSP とすると、この条件を共に満たす菌株は左上

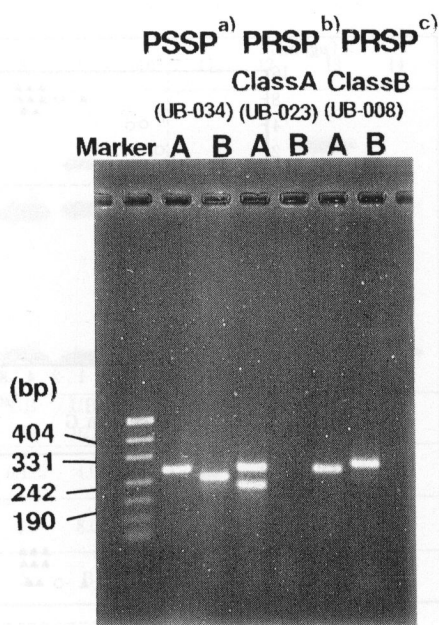


Fig. 1. Agarose gel electrophotogram of PCR-amplified DNA fragments of the autolysin (*lytA*) and PBP 2 B (*penA*) genes. a) penicillin-sensitive *Streptococcus pneumoniae* strain UB-034; b) penicillin-resistant *S. pneumoniae* strain UB-023; c) penicillin-resistant *S. pneumoniae* strain UB-008. Tube A contains two sets of primers, for amplification of *lytA* and class A PBP-2A genes, respectively. Tube B contains two sets of primers, for amplification of class B and normal PBP-2B genes, respectively.

の図に点線で囲んだ 15 株であった。そのうち、▲印で示した 10 株は class B の PRSP、■印で示した 1 株は class A の PRSP と識別された。

しかしながら、○印で示した 4 株では、変異した PBP 2 B を検出するためのプライマーでは DNA の増幅が認められず、PSSP の PBP 2 B 検出用のプライマーで DNA が増幅された。つまり、PRSP でありながら、class S と判定されていたことで、両者の成績が必ずしも一致していない菌株がみられた。

また、PCG には 0.063 μ g/ml の MIC を示し、MIPIC に 1.0 μ g/ml の MIC を示した株が 1 株存在したが、これも PRSP でありながら class S と判定さ

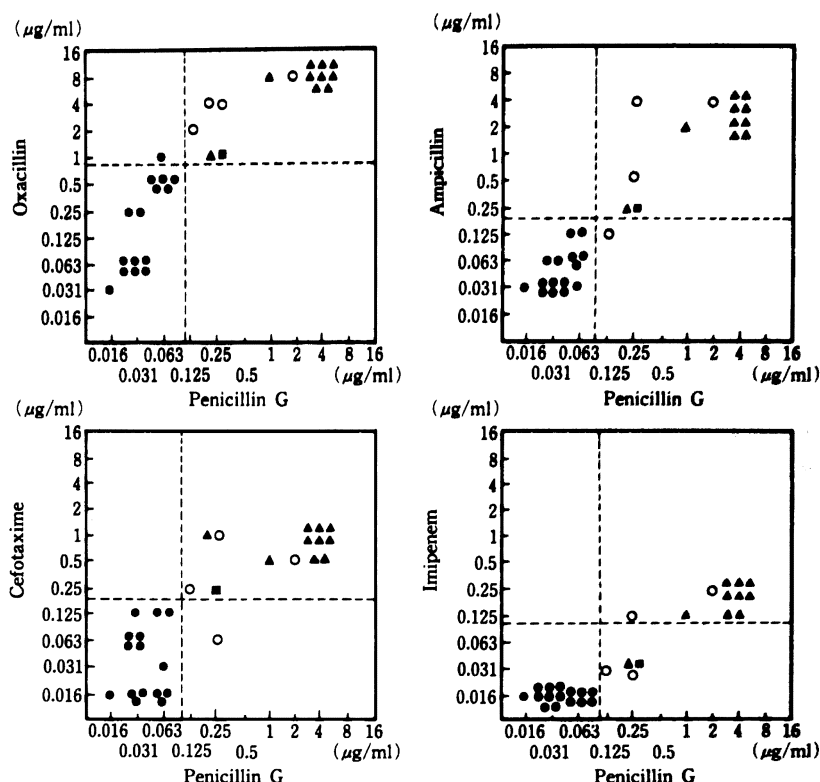


Fig. 2. Correlations between the presence of the PBP 2 B (*penA*) gene and β -lactam susceptibilities in 30 *Streptococcus pneumoniae* strains. ○ and ● normal *penA*-positive strains by PCR; ■: class A *penA*-positive strains by PCR; ▲: class B *penA*-positive strains by PCR. The breakpoints for sensitivity and resistance to penicillin G and oxacillin are based on the recommendations of the NCCLS⁹⁾.

れている。

一方、PCGに $<0.125 \mu\text{g/ml}$ 、MIPICにも $<1.0 \mu\text{g/ml}$ のMICを示すPSSPの14株では、すべてPSSPのPBP 2 B検出用のプライマーでDNAが増幅されており (class S)、両者の成績は一致していた。

また、PCGとABPCとの関係、あるいはCTXやIPMとの関係についても図中に示した。その結果、PRSPとPSSPについての識別は一応可能であったが、PBP 2 Bの変異を検出するPCRの成績とは一致しない株がわずかではあるが、存在するという成績であった。

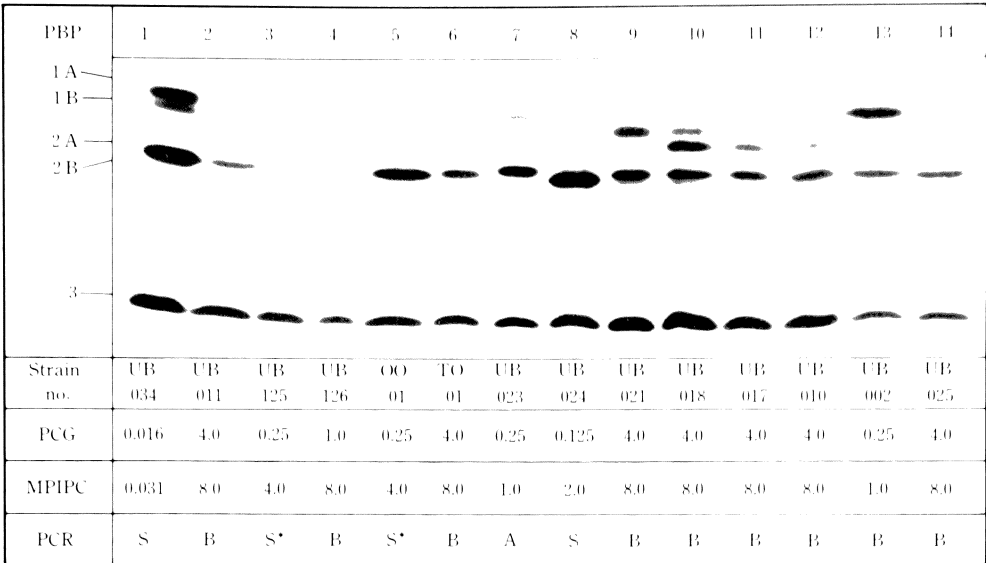
2) PBPとMICとの関係

Fig. 3には、PCGに対するMICが $0.125 \mu\text{g/ml}$ 以上の菌株について、 $[^3\text{H}]$ -PCGを用いてPBPの

親和性を解析した成績を示す。

一番左端のカラム-1はコントロールとして用いたPSSPのUB-034株の成績である。図中に記したように、肺炎球菌のPBPは分子量の大きい方から順に、PBP 1A、PBP 1B、PBP 2A、PBP 2B、PBP 3と称されている。ただしこの写真ではPBP 2AとPBP 2Bの分子量が近似しているため、太い1本のバンドとなって示されている。

カラム-2以降の菌株では、カラム-8のUB-024株を除いて、PBP 2 Bの存在を示す太いバンドはほとんど検出されず、PBP 2 Bに対する β -ラクタム系薬の親和性が低下していると判断された。また、コントロール株のPBPに比しては、PBP 1AやPBP 1B、あるいはPBP 2Aのバンドがきわめて薄くなっているか、ほとんど認められない菌株も多く見いだされ、



PCG: penicillin G, MPIPC: oxacillin

Fig. 3. Fluorogram of the penicillin-binding proteins of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Membrane fractions were incubated with [³H]-PCG for 10 min at 32°C, sarcosyl solubilized, and electrophoresed.

これらのPBP_sに対する親和性もPSSPに比しては低下している菌株が多く存在していることが示された。

一方、カラム-8に示したPBP 2 Bが検出されたUB-024株では、PBP 1 A、1 Bに対する親和性は極端に低下していた。この株のPCGに対するMICは0.125 µg/ml、MPIPCに対するMICも2.0 µg/mlとなっており、感受性の上からは軽度のPRSPということになるが、PCRではPBP 2 Bの変異は検出されず、class Sと判定されている。

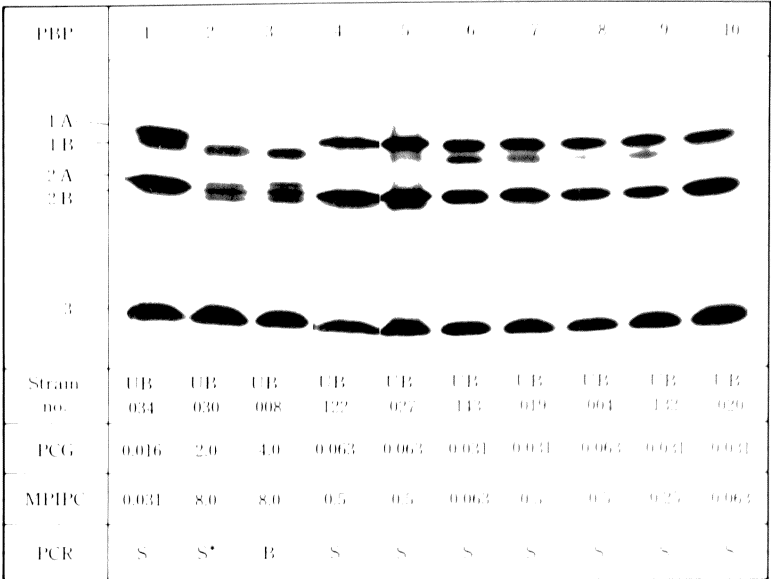
同様に、図中に★印を付したUB-125株とOO-01株も、MICの上からは明らかなPRSPであったが、これもPCRではclass Sと判定された株である。これら2株はPBP 2 Bに対する [³H]-PCGの親和性は明らかに低下しており、PCRの成績が一致していないことが示された。

Fig. 4のカラム-2と3には、PBP 2 Xと呼ばれるPBPが検出されたUB-030株とUB-008株の成績を示す。この2株はPCGに2.0 µg/mlと4.0 µg/mlのMICを示し、薬剤感受性の上からは明らかなPRSPと判定されている。また、これらの株では、2 Xの他にPBP 1 Aがまったく検出されず、加えてPBP 2 Aや2 Bに対する [³H]-PCGの親和性も感性

菌に比しては低下していた。ただし、この2株はPBPについての成績は同じであるが、PCRの成績ではUB-008株はclass BのPRSP、もう1株のUB-030株はclass SでPSSPと判定されている。

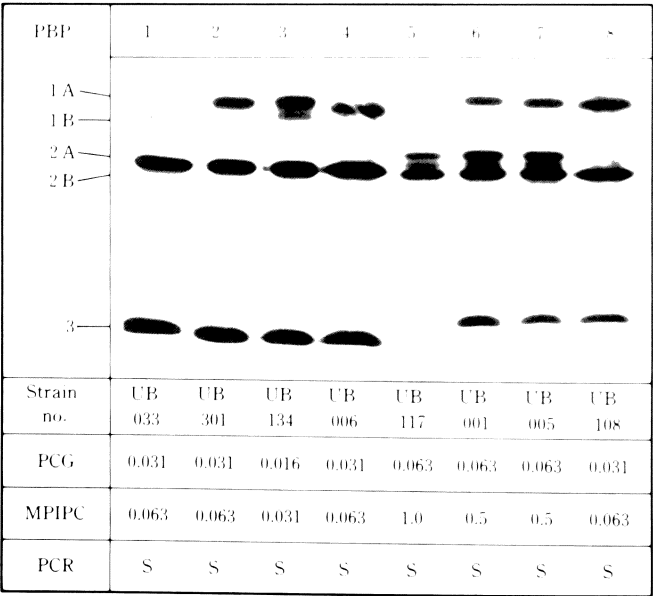
一方、Fig. 4のカラム-4以降の菌株は、図の下段に示したように、薬剤感受性の成績でPSSPと判定された株である。UB-122、UB-027、UB-004、UB-132、UB-020の5株では、PBP 1 Bに対する [³H]-PCGの親和性が低下していた。

Fig. 5は、PCGとMPIPCに対するMICの上からは、共にPSSPと判定された菌株であるが、Fig. 4に示したPSSPとはやや異なったPBPパターンを示した菌株である。カラム-3に示したコントロールのUB-034株のPBPに比較すると、①PBP 1 Aの親和性が低下しているUB-033株、②PBP 1 Bの親和性が低下しているUB-301株、UB-006株、③PBP 1 A、1 B、ならびに3の親和性が低下し、さらに2 Xが見いだされたが、PBP 2 Bの親和性は正常と思われるUB-117株、④PBP 1 Bの親和性が低下し、2 Xが認められるが、PBP 2 Bの親和性は正常と判断されるUB-001株とUB-005株、そして、⑤右端に示したPBP 1 Bと2 Aの親和性は低下しているが、PBP 2 Bの親和性はほぼ正常であろうと判断されたUB-108



PCG: penicillin G, MIPIC: oxacillin

Fig. 4. Fluorogram of the penicillin binding proteins of two penicillin resistant and seven penicillin sensitive strains of *Streptococcus pneumoniae*.



PCG: penicillin G, MIPIC: oxacillin

Fig. 5. Fluorogram of the penicillin-binding proteins of penicillin sensitive *Streptococcus pneumoniae*.

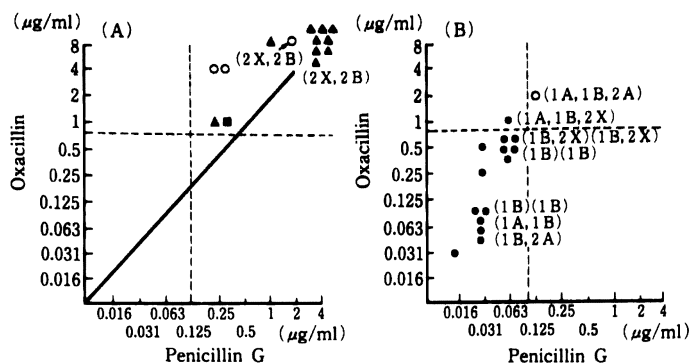


Fig. 6. Correlations between the affinity of penicillin-binding proteins and the presence of normal or altered PBP 2 B genes in penicillin-resistant and -sensitive *Streptococcus pneumoniae*. (A) reduction of affinity of [³H]-PCG for PBP 2 B; (B) normal affinity of [³H]-PCG for PBP 2 B. ○ and ● normal *penA*-positive strains by PCR; ■: class A *penA*-positive strain by PCR; ▲: class B *penA*-positive strains by PCR.

株である。このように様々な PBP パターンを示している菌株においても、PBP 2 B に対する親和性は正常と判断される菌株においては、MIC の上からは PSSP と判定される菌株も多いという成績となった。

3) 薬剤感受性, PCR, ならびに PBP_s の成績との関係

Fig. 6 は, ①PBP の親和性の成績を中心に, ② PCG と MIPIC に対する MIC と, ③PBP 2 B 遺伝子の PCR の成績について 3 者の関係をまとめたものである。

図の (A) には, PBP 2 B に対する [³H]-PCG の親和性が低下していると判断された 14 株の成績を示してある。これらの菌株はすべて PCG に対して $\geq 0.25 \mu\text{g/ml}$, MIPIC に対しても $\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$ の MIC を示し, 薬剤感受性の成績と PBP の親和性の成績とが一致していた。しかしながら, PCR の成績では, 14 株中 11 株は class B の PRSP, 1 株は class A の PRSP に識別できたものの, ○印で示した 3 株は class S, すなわち PSSP と判定され, PRSP の識別には役だっていない。

一方, 図の (B) に示した株は, PBP 2 B の親和性は正常と判定された菌株である。その他の PBP に対する緩和性の低下は () 内に記したが, これらの菌株では PBP 1 A や 2 A の親和性が低下している株と, 2 X が出現している株では MIPIC に対する MIC がやや高いと思われたが, 菌株数が少ないため

に明確な相関性は見いだせなかった。

III. 考 察

PRSP における薬剤耐性機構は, すでに欧米の研究者によって多数報告されており, 前述したように, いくつかの PBP_s に対する β -ラクタム系薬の親和性の低下が複雑に関与していることが明らかにされている⁹⁾。その中でも, ペニシリン軽度耐性には PBP 1 A の変異や 2 X の出現, 明らかなペニシリン耐性には PBP 2 B の変異が関わっていることが指摘されている²²⁾。

これらの PBP 1 A²³⁾, PBP 2 X^{24,25)}, PBP 2 B^{18,19)} をコードしているそれぞれの遺伝子も, すでにその塩基配列が決定されており, PSSP の遺伝子との比較から, PRSP に見いだされるこれらの遺伝子は, 他のレンサ球菌由来の塩基配列がモザイク的に部分挿入されたものといわれる。注目すべきことは, これらの遺伝子は比較的容易に PSSP を PRSP へと形質転換することが可能である^{25,26)} ことで, 口腔レンサ球菌の *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* 等をもペニシリン耐性菌へと形質転換できる²⁷⁾ ことである。また, これらの形質転換によって, 明らかなペニシリン耐性は PBP 2 B の遺伝子変異が関与していることが裏付けられている。最近では, さらに, PBP 2 B 遺伝子の変異には, 由来の異なる class A と class B のあることが指摘されている²⁸⁾ が, それと他のペニシリン耐性レンサ球菌の塩基配列

とを比較するときわめて似通っている。この事実から、PRSPの耐性遺伝子の一部領域は口腔に常在するレンサ球菌由来であると推定される^{29,30)}。そして、肺炎球菌に伝達された耐性遺伝子が次第に血清型の異なった肺炎球菌へ水平伝達されながら、その性状を少しずつ変えていったと考えられる³¹⁾。

現在、世界各地に広まっているPRSPを薬剤耐性パターン、血清型、PBPsパターン等から総合的に解析すると、2種類のスペイン由来株、1種類のハンガリー由来株、1種類のアラスカ由来株に分けられる³²⁾。

我々が示した結果もまた、我が国におけるPRSPが世界で主流を占めるPBP2B遺伝子の変異に基づくβ-ラクタム系薬の親和性の低下が耐性機構の主たるものであることを示唆している。しかしながら、上述したPBP2Bの2種類の変異のうち、大部分の株がclass B変異のPRSPであり、class A変異株は意外と少ないことが注目された。今回は血清型は検討していないが、清水等(抄録No. 135, 第42回日本化学療法学会総会発表)の検討によると、本邦のPRSPでも23Fや19型が多いと報告されている。これらはスペイン由来株で多く認められている血清型であるが、本邦のPRSPにはマクロライド系薬にも耐性を示す菌株が多く、耐性型ではハンガリー由来のPRSPに近い。一方、我が国のPRSPのPBPsに対するβ-ラクタム系薬の親和性の変化は、PBP1A, 2Bのみならず、1Bの親和性も低下している株も認められる。加えて、PSSPでもPBP1Bの親和性が低下している株も認められるという結果が示された。PBP1Bの変異そのものは、ペニシリンの耐性度にほとんど関与していないと推定されるが、なぜ本邦においてPBP1Bの変異株が多いのかは、今後明らかにしていく必要がある。

一方、我々の研究の中で、今までに報告されていないPRSPが3株含まれていたことも注目されよう。すなわち、PCGに対して明らかな耐性を示す菌で、PBP2Bに対するβ-ラクタム系薬の親和性が低下しているにもかかわらず、class Aやclass BのPRSPではない菌株である。現在これらの菌株のPBP2B遺伝子について、活性中心のセリン残基を含む領域の塩基配列を決定中であるが、class Bの変異部分に近い位置に特異的な変異のあることが見いだされている。この成績については別に発表したいと考えているが、その他にもさらに異なった変異株の存在する可能性も否定できず、PCG感性でメトキシミノ基を有するセフェム系薬耐性株(北山等, 抄録No. 035 第

42回日本化学療法学会総会発表)、あるいはその逆の株を含めて耐性機構を解明する必要がある。

最近、米国においてはPRSPによる化膿性髄膜炎例からCTXやCTRに1.0 μg/ml以上のMICを示すPRSPも検出され始めており³³⁾、CTXやCTRが無効であった例も報告されている³⁴⁻³⁶⁾。PRSPによる化膿性髄膜炎にはCTXの大量投与を主張する研究者もいるが、PBPsの変異という耐性のメカニズムを配慮すれば、ペニシリン耐性の場合、基本的にはセフェム系薬にも何らかの耐性を示すと理解すべきである。なかにはカルバペネム系薬のように、比較的優れたMICを示す薬剤もあるが、Fig. 2に示したように、PRSPのカルバペネム系薬に対するMICはPSSPのそれとはやはり明らかに異なっていることに留意しなければならない。

現在、耐性菌が認められないのはvancomycinのみであるが、本薬の作用機序は静菌的であり、髄液への移行は必ずしも良好ではない。単独投与では再燃例も多く見られている³⁷⁾。今後、PCR法³⁸⁾等によるPRSPの早期診断システムを確立すると共に、治療薬と治療法についての検討も必要であると考えられた。

本研究は平成5年10月14日に青森で開催された日本化学療法学会東日本支部総会において発表した。

文 献

- 1) 永見京子, 他: ペニシリン耐性肺炎球菌髄膜炎の1例と小児より分離された肺炎球菌抗菌剤感受性の検討。感染症誌 64: 725~732, 1990
- 2) 生方公子, 他 (36施設): 全国各地で分離された肺炎球菌の疫学的研究。感染症誌 68: 1338~1351, 1994
- 3) 有益 修, 目黒英典, 白石裕昭, 菅又久美子, 比留間藤昭, 阿部敏明: β-ラクタム剤が無効であった肺炎球菌髄膜炎の1例。感染症誌 62: 682~683, 1988
- 4) 春田恒和, 他: Panipenem/Betamipronの小児領域感染症に対する有効性, 安全性の検討および髄液移行の検討。ペニシリン耐性肺炎球菌髄膜炎症例を含めて。Jap. J. Antibiot. 45: 416~423, 1992
- 5) 重野秀明, 山崎 透, 永井寛之, 後藤陽一郎, 田代隆良, 那須 勝, 野路弓子, 小此木研二: β-ラクタム薬耐性肺炎球菌性肺炎で死亡した1例と分離菌の耐性機序。感染症雑誌 66: 508~514, 1992
- 6) 佐藤幸一郎, 実村 信: 小児におけるpenicillin低感受性*S. pneumoniae*感染症の経験。感染症誌 63: 189~193, 1989
- 7) 諸岡達也, 広田 修, 大蔵美佐子, 伊藤 晃, 郭明烈, 柴田昌彦, 山口 寛, 竹尾浩美: 治療経過が遷延したペニシリン耐性肺炎球菌による急性中耳炎の2例。小児感染免疫 6: 7~9, 1993
- 8) National Committee for Clinical Laboratory Stand-

- rd. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. 1993
- 9) Klugman K P: Pneumococcal resistance to antibiotics. Clin Microbiol Rev 3: 171~196, 1990
 - 10) Hakenbeck R, Tarpay M, Tomasz A: Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 17: 364~371, 1980
 - 11) Percheson P B, Bryan L E: Penicillin-binding components of penicillin susceptible and -resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 18: 390~396, 1980
 - 12) Zigelboim S, Tomasz A: Penicillin-binding proteins of multiply antibiotic-resistant South African strains of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 17: 434~442, 1980
 - 13) Hakenbeck R, Ellerbrok H, Brise T, Handwenger S, Tomasz A: Penicillin-binding proteins of penicillin-susceptible and -resistant pneumococci: immunological relatedness of altered proteins and changes in peptides carrying the β -lactam binding site. Antimicrob Agents Chemother 30: 553~558, 1986
 - 14) Jabes D, Nachman S, Tomasz A: Penicillin-binding protein families: Evidence for the clonal nature of penicillin resistance in clinical isolates of pneumococci. J Infect Dis 159: 16~25, 1989
 - 15) Hakenbeck R, Briese T, Chalkley L, Ellerbrok H, Kalliokoski R, Latorre C, Leinonen M, Martin C: Antigenic variation of penicillin-binding proteins from penicillin-resistant clinical strains of *Streptococcus pneumoniae*. J Inf Dis 164: 313~319, 1991
 - 16) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
 - 17) Ubukata K, Yamasita N, Konno M: Occurrence of a β -lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 27: 851~857, 1985
 - 18) Dowson C G, Hutchison A, Spratt B G: Nucleotide sequence of the penicillin-binding protein 2 B gene of *Streptococcus pneumoniae* strain R 6. Nucleic Acids Res 17: 7518, 1989
 - 19) Dowson C G, Hutchison A, Spratt B G: Extensive re-modelling of the transpeptidase domain of penicillin-binding protein 2 B of a penicillin-resistant South African isolate of *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol 3: 95~102, 1989
 - 20) Garcia P, Garcia K L, Garcia E, Lopez R: Nucleotide sequence and expression of the pneumococcal autolysin gene from its own promoter in *Escherichia coli*. Gene 43: 265~272, 1986
 - 21) Ubukata K, Nakagami S, Nitta A, Yamane A, Kawakami S, Sugiura M, Konno M: Rapid detection of the *mecA* gene in methicillin-resistant staphylococci by enzymatic detection of polymerase chain reaction products. J Clin Microbiol 30: 1728~1733, 1992
 - 22) Markiewicz Z, Tomasz A: Variation in penicillin-binding protein patterns of penicillin-resistant clinical isolates of pneumococci. J Clin Microbiol 27: 405~410, 1989
 - 23) Martin C, Sibold C, Hakenbeck R: Relatedness of penicillin-binding protein 1a genes from different clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated in South Africa and Spain. EMBO J 11: 3831~3836, 1992
 - 24) Laible G, Hakenbeck R, Sicard M A, Joris B, Ghuyssen J M: Nucleotide sequences of the *pbpX* genes encoding the penicillin-binding proteins 2X from *Streptococcus pneumoniae* R 6 and a cefotaxime-resistant mutant, C 506. Mol Microbiol 3: 1337~1348, 1989
 - 25) Laible G, Spratt B G, Hakenbeck R: Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol 5: 1993~2002, 1991
 - 26) Munoz R, Dowson C G, Daniels M, Coffey T J, Martin C, Hakenbeck R, Spratt B G: Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol 6: 2461~2465, 1992
 - 27) Potgieter E, Chalkley L: Reciprocal transfer of penicillin resistance genes between *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis*, and *Streptococcus sanguis*. J Antimicrob Chemother 28: 463~465, 1991
 - 28) Dowson C G, Hutchison A, Brannigan J A, George R C, Hansman D, Linares J, Tomasz A, Smith J M, Spratt B G: Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Proc Natl Acad Sci USA 86: 8842~8846, 1989
 - 29) Chalkley L, Schuster C, Potgieter E, Hakenbeck R: Relatedness between *Streptococcus pneumoniae* and viridans streptococci: transfer of penicillin resistance determinants and immunological similarities of penicillin-binding proteins. FEMS Microbiol Lett 90: 35~42, 1991
 - 30) Dowson C G, Coffey T J, Kell C, Whitley R A: Evolution of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*; the role of *Streptococcus mitis* in

- the formation of a low affinity PBP 2B in *S. pneumoniae*. *Mol Microbiol* 9: 635~643, 1993
- 31) Coffey T J, Dowson C G, Daniels M, Zhou J, Martin C, Spratt B G, Musser J M: Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 5: 2255~2260, 1991
- 32) Munoz R, Musser J M, Crain M, Briles D E, Marton A, Parkinson A J, Sorenson U, Tomasz A: Geographic distribution of penicillin-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*: characterization by penicillin-binding protein profile, surface protein A typing, and multilocus enzyme analysis. *Clin Infect Dis* 15: 112~118, 1992
- 33) Figueiredo A M, Connor J D, Severin A, Vaz Pato M V, Tomasz A: A pneumococcal clinical isolate with high-level resistance to cefotaxime and ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 886~889, 1992
- 34) Bradley J S, Connor J D: Ceftriaxone failure in meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Pediatr Infect Dis J* 11: 871~873, 1991
- 35) Sloas M M, Barrett F F, Chesney J P, English B K, Hill B C, Tenover F C, Leggiadro R: Cephalosporin treatment failure in penicillin- and cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 11: 662~666, 1992
- 36) Kleiman M B, Weinberg G A, Reynolds J K, Allen S D: Meningitis with beta-lactam resistant *Streptococcus pneumoniae*; the need for early repeat lumbar puncture. *Pediatr Infect Dis J* 12: 782~784, 1993
- 37) Viladrich P F, Gudiol F, Linares J, Pallares R, Sabate I, Rufi G, Ariza J: Evaluation of vancomycin for therapy of adult pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2467~2472, 1991
- 38) Rudolph K M, Parkinson A J, Black C M, Mayer L W: Evaluation of polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia. *J Clin Microbiol* 31: 2661~2666, 1993

Mechanism of resistance in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: Analysis of penicillin-binding proteins and the PBP 2 B gene

Kimiko Ubukata, Mutumi Sugiura and Masatoshi Konno

Department of Clinical Pathology, Teikyo University, School of Medicine, Tokyo, Japan

Shigeru Ohnari

Department of Pediatrics, Saiseikai Hiroshima Hospital, Hiroshima, Japan

Akio Yamane

Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd., Hiroshima, Japan

Susceptibility to β -lactam antibiotics, affinity of penicillin-binding proteins (PBPs), and the detection of the PBP 2 B gene (*penA*) by the polymerase chain reaction (PCR) were studied using 30 clinical strains of pneumococci isolated in 1993. The following results were obtained:

1) Fifteen of strains were identified as penicillin (PCG)-resistant strains of pneumococcus (PRSP), with minimum inhibitory concentrations (MIC) of PCG $\geq 0.125 \mu\text{g/ml}$.

2) The MICs of oxacillin, ampicillin, cefotaxime, cefdinir, and imipenem clearly differed in PRSP and PCG-sensitive strains of pneumococcus (PSSP).

3) PCR was performed by preparing three sets of primers for amplification of part of the PBP 2 B gene in order to differentiate between PRSP and PSSP. DNA from 15 strains with a PCG MIC $< 0.125 \mu\text{g/ml}$ was amplified using primers for detection of sensitive strains. The strains for which DNA was amplified with primers for PRSP detection all had MICs $\geq 0.125 \mu\text{g/ml}$. These strains consisted of one class A strain and ten class B strains. However, DNA was amplified by primers for PSSP even in four PRSP strains.

4) In PRSP strains, the affinity of [^3H]-PCG for PBP 2 B was reduced, and affinity for PBP-1 A or PBP-1 B was also reduced in many strains. Some PSSP strains showed reduced affinity for PBP-1 A or PBP 1 B, and PBP-2 X newly appeared in some strains.

These results suggest that many PRSP in Japan are variable strains with an altered PBP 2 B gene belonging to class B, that there are few class A strains, and that there are PCG-resistant strains with changes in the PBP-2 B gene that have not yet been reported.