

Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* 選択培地の試作と臨床材料への応用

松田 淳一・菅原 和行・吉田 良滋・朝野 和典・賀来 満夫
長崎大学附属病院検査部*

(平成7年1月20日受付・平成7年6月12日受理)

近年、penicillin耐性 *Streptococcus pneumoniae* (PRSP)の増加が注目されている。そこで、本菌の迅速で簡易な検出を目的に選択培地 (PRSP-SM) を作製した。培地組成は、Trypticase Soy II Agar に5%ヒツジ血液を添加した培地に、選択剤として oxacillin 0.1 mg/l, aztreonam 10 mg/l, gentamicin 5 mg/l を添加した。PRSP-SM の選択性は、penicillin感受性 *S. pneumoniae* (PSSP) 112株中91株 (81%) の発育を阻止し、PRSP 70株については、100%の発育が認められた。グラム陰性菌群については、*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Serratia marcescens*, *Xanthomonas maltophilia* の一部の株に発育が認められたものの、その他の菌種は発育を阻止した。また、今回使用した各選択剤の経時的力価変動について検討した結果、4°C冷蔵保存した場合、oxacillinで42日間、aztreonam, gentamicinについては、90日間安定した成績が得られた。臨床検体をPRSP-SMに直接塗布した場合、翌日にPRSPの存在が推定できた。また、本菌種と同時に検出されることが多い *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Branhamella catarrhalis*などを発育阻止するとともに、PSSPとの混在例についてもPRSPを正確に検出することができた。

Key words: penicillin resistant *S. pneumoniae*, Selective Medium

Streptococcus pneumoniae は、肺炎や慢性気道感染症などの起炎菌としてその検出率は高い。本菌種は、penicillin系抗菌薬に高い感受性を示すために、従来は、治療上あまり問題となることはなかったが、1967年に初めてオーストラリアでbenzylpenicillin (PCG)に対し、MIC値が0.1 µg/ml以上を示す耐性株が分離されて以来¹⁾、国際的に波及し、わが国においても分離例が多数報告され、化学療法上大きな問題となりつつある。今回我々は、臨床材料中の耐性株を確実にかつ迅速に検出するために、PCG耐性 *S. pneumoniae* (PRSP) の選択培地 (PRSP-SM) を考案し、基礎的検討と臨床材料への応用を試み若干の知見を得たので報告する。

I. 材料および方法

1. 供試菌株

1989年から1994年までの当院で分離された臨床分離株、*Escherichia coli* 8株、*Klebsiella pneumoniae* 12株、*Serratia marcescens* 11株、*Enterobacter cloacae* 8株、*Enterobacter aerogenes* 8株、*Pseudomonas aeruginosa* 34株、*Acinetobacter baumannii* 21株、*Xanthomonas maltophilia* 5株、*Pseudomonas cepacia* 4株、*Haemophilus influenzae* 17株、*Haemophilus parainfluenzae* 17株、*Haemophilus parahaemolyticus* 9株、*Branhamella catarrhalis* 7株、*Neisseria* spp. 6株のグラム陰性菌群14菌種167株と *Staphylococcus aureus* 26株、*Staphylococcus epidermidis* 13株、PCG sensitive *S. pneumoniae* (PSSP) 112株、PCG resistant *S. pneumoniae* (PRSP) 70株、*Streptococcus pyogenes* 6株、

Streptococcus spp. 18株、*Enterococcus faecalis* 7株、*Enterococcus faecium* 2株、*Corynebacterium xerosis* 2株、*Candida albicans* 9株、*Candida tropicalis* 3株のグラム陽性菌群11菌種272株を用いた。なお、*S. pneumoniae* の同定は、5%ヒツジ血液加Trypticase Soy II Agar培地 (BECTON, DICKINSON) を用い5%炭酸ガス下で35°C 20時間培養した後、菌集落がα溶血性を呈し、集落中央部が陥没した形態をとるグラム陽性の双球菌で、3%カタラーゼ試験陰性、肺炎球菌鑑別用オプトヒンディスク (栄研化学) を用い、13 mm以上の阻止円を形成した株で、かつ10%デオキシコール酸ナトリウム²⁾による胆汁酸溶解試験陽性株を *S. pneumoniae* と同定した。また、PRSPの判定は、benzylpenicillin (PCG, 明治製薬) に対するMIC値を日本化学療法学会標準法に準じ³⁾自家調整し、MIC-2000を用いたマイクロイオン希釈法にて測定し、PCGのMIC値0.1 µg/ml以上を示した株を耐性株と判定した。

2. 選択培地の作成

1) PCGとMIPICのMIC値の相関

1989年から1994年までの当院で分離された *S. pneumoniae* 110株を使用し、日本化学療法学会標準法に準じ、PCGとoxacillin (MIPIC, 萬有製薬) ミクロイオン希釈法にて測定した。

2) 選択培地組成

PRSP-SMは、Trypticase Soy II Agar (TSA II) 40gを950mlの精製水に懸濁し、オートクレーブで滅

* 長崎市坂本1丁目7-1

菌し、50°C付近まで冷却後ヒツジ血液 50 ml と選択剤として oxacillin (MPIPC, 萬有製薬) 0.1 mg, gentamicin (GM, エッセクス) 5 mg, aztreonam (AZT, エーザイ) 10 mg の 3 抗菌薬を同時に添加し作製した。

3) 選択培地選択力の経時的变化

PRSP-SM の選択性の経時的变化は、5%ヒツジ血液加 TSA II に、MPIPC を終濃度として (0.78, 0.39, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 mg/l) の 6 段階濃度、GM を同じく終濃度として (50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 mg/l), AZT も同様に終濃度として (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 mg/l) 各々を添加した抗菌薬含有培地を作成した。作成した培地はただちに真空パックし、使用するまでは 4°C にて保存した。抗菌薬力価測定株としては、MPIPC は、*S. aureus* と *S. pneumoniae* の 2 菌種、GM は、*E. faecalis*, AZT は、*A. baumannii* を使用した。測定方法は、各々の菌株を滅菌生理食塩水で McFarland 1.0 となるように懸濁し、その懸濁液を滅菌生理食塩水で 10^4 倍希釈した菌液を、それぞれ対象とする選択剤含有培地にスパイラルプレーター D 型 (スパイラル社) を用い 47 μ l ずつ塗布した。塗布後 35°C 5% 炭酸ガス下 20 時間培養し、各々の菌種の発育性を培地調整当日から 7 日間隔で 91 日計 14 回測定した。

4) 臨床材料への応用

PRSP-SM の臨床材料への応用として、1991 年 1 月から同年 12 月までの当院で日常検査として提出された喀痰を -80°C に凍結し、*S. pneumoniae* が検出された喀痰 (同一患者検体を省く) 43 検体を対象に、その喀痰を室温で融解後、スプーターザイム (極東製薬) にて喀痰溶解し、滅菌生理食塩水で 10^2 倍・ 10^4 倍に希釈した。希釈した検体を、スパイラルプレーターを用い、PRSP-SM とコントロールとして抗菌薬無添加の TSA II ヒツジ血液寒天培地および TSA II ヒツジ血液寒天培地に GM 5 mg/l, AZT 10 mg/l の 2 薬剤を添加した 3 種の培地に塗布した後に培養し、*S. pneumoniae* の発育菌数を比較検討した。

II. 成績

1. PCG と MPIPC の MIC 値の相関

S. pneumoniae 110 株について PCG と MPIPC の MIC 値を測定した結果を Fig. 1 に示した。両者の相関性は、相関係数 $r=0.902$ 、回帰式 $y=0.208X-0.007$ と高い相関性が認められた。PCG で感受性の上限である 0.05 μ g/ml 以下を示す 82 株のうち、MPIPC の 0.1 μ g/ml 以下が 66 株 (66/82; 80.5%) であった。また、PCG が 0.025 μ g/ml 以下を示した株は 67 株 (67/82; 82%) 存在し、その 67 株中 63 株 (94%) は、MPIPC でも 0.1 μ g/ml 以下であった。PCG で 0.1 μ g/ml 以上を示した PCG 耐性株 28 株のすべての株が、MPIPC では 0.78 μ g/ml 以上を示したことから、MPIPC を 0.1 μ g/ml 培地中に添加することにより約 20% の感受性菌群を含むものの耐

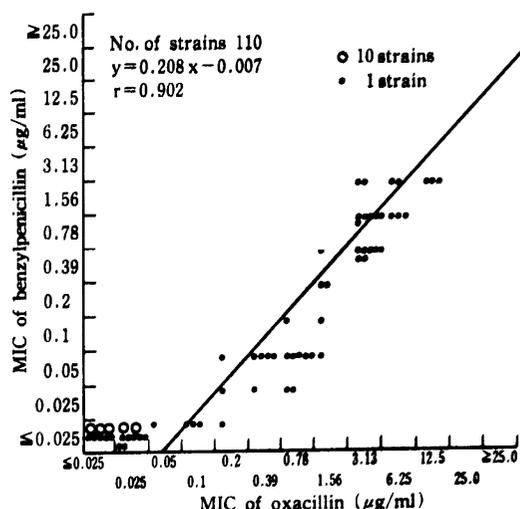


Fig. 1. MIC distribution of benzylpenicillin and oxacillin against *Streptococcus pneumoniae*.

性株と感受性株とが区分化された。

2. 選択性の検討

PRSP 以外の菌種の発育を抑制するために、MPIPC, AZT, GM を加えた PRSP-SM での発育抑制効果を Table 1 に示した。PSSP 112 株中 91 株 (81%) が発育阻止されたが、PRSP 70 株は、すべて発育が認められ、本選択培地の偽陽性率は約 19% 程度、偽陰性率は 0% であった。本菌種以外のグラム陰性菌群 14 種 167 株の選択性を確認した結果、発育が認められた菌種は、*P. aeruginosa* 34 株中 5 株 (15%), *P. cepacia* 4 株中 2 株 (50%), *S. marcescens* 11 株中 1 株 (9%), *X. maltophilia* 5 株中 1 株 (20%) に発育が認められたものの他の菌種は、すべて発育を阻止された。

3. 選択剤の経日の力価変動

培地中の選択剤の経日の力価変動を Fig. 2 に示した。MPIPC については、培地作製後 42 日目で 1 管程度の力価の低下が認められたものの、GM と AZT については、91 日間安定した成績が得られた。したがって、本選択培地は、4°C で冷蔵庫に保存した場合、培地作製後 1 か月程度十分に安定した成績が得られるものと思われる。

4. 臨床材料への応用

今回我々が作製した PRSP-SM の臨床材料への応用として、当院で *S. pneumoniae* が検出された喀痰 43 例について検討した結果を Fig. 3 に示した。PRSP が検出されなかった 29 例では、TAS II ヒツジ血液寒天培地上の *S. pneumoniae* のコロニー数と GM・AZT のみの選択剤を添加したヒツジ血液寒天培地上のコロニー数とがほぼ同数であった。また、PRSP が検出された 14 例について、PRSP-SM と対照として GM, AZT のみを添加したヒツジ血液寒天培地上の *S. pneumoniae* のコロニー数とを比較すると明らかに差が認められた検体

Table 1. Percentage of grown strains incubated in selective medium for PCG-resistant *Streptococcus pneumoniae*
(1) gram-negative bacteria

Organism	Total no. of strains	No. of strains grown	Percentage
<i>E. coli</i>	8	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	12	0	0
<i>S. marcescens</i>	11	1	9
<i>E. cloacae</i>	8	0	0
<i>E. aerogenes</i>	8	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	34	5	15
<i>A. baumannii</i>	21	0	0
<i>X. maltophilia</i>	5	1	20
<i>P. cepacia</i>	4	2	50
<i>H. influenzae</i>	17	0	0
<i>H. parainfluenzae</i>	17	0	0
<i>H. parahaemolyticus</i>	9	0	0
<i>B. catarrhalis</i>	7	0	0
<i>Neisseria</i> spp.	6	0	0

(2) gram-positive bacteria

Organism	Total no. of strains	No. of strains grown	Percentage
<i>S. aureus</i>	26	10	39
<i>S. epidermidis</i>	13	13	100
<i>S. pneumoniae</i> (PCG-S)	112	21	19
<i>S. pneumoniae</i> (PCG-R)	70	70	100
<i>S. pyogenes</i>	6	0	0
<i>S. agalactiae</i>	5	5	100
<i>Streptococcus</i> spp.	18	14	78
<i>E. faecalis</i>	7	7	100
<i>E. faecium</i>	2	2	100
<i>C. xerosis</i>	2	2	100
<i>C. albicans</i>	9	9	100
<i>C. tropicalis</i>	3	3	100

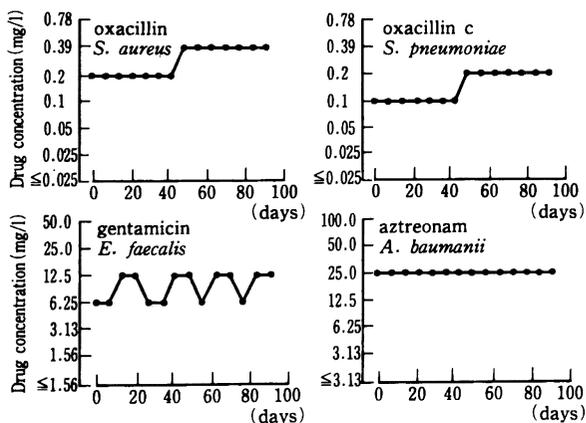


Fig. 2. Daily change in drug activity in the medium against various organisms.

が14例中2例検出され、これらの検体を精査した結果、PSSPとPRSPの混在例によることが判明した。

III. 考 察

PRSPは、1967年にHansmanによりオーストラリアで初めて無ガンマグロブリン血症をもつ気管支拡張症患者の喀痰より分離され¹⁾、さらに1977年に南アフリ

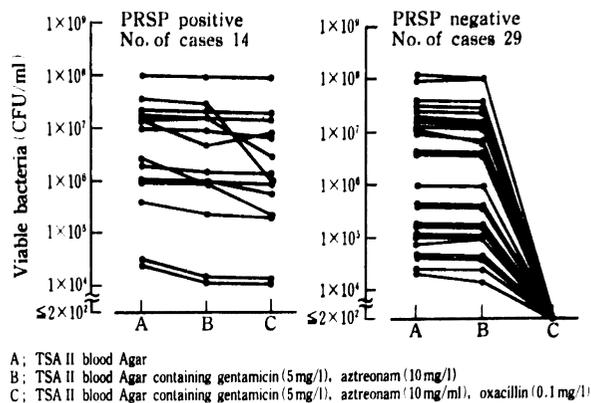


Fig. 3. Number of viable pneumococci from sputum on TSA II blood Agar and on selective TSA II blood Agar.
A: TSA II blood Agar
B: TSA II blood Agar containing gentamicin (5mg/l), aztreonam (10mg/l)
C: TSA II blood Agar containing gentamicin (5mg/l), aztreonam (10mg/ml), oxacillin (0.1 mg/l)

カのヨハネスブルグでβ-ラクタム薬をはじめとする多剤耐性の*S. pneumoniae*による感染症が多発し、次第に注目されるようになった⁴⁾。わが国においても1980年代後半から諸施設よりPRSPの分離頻度の増加が報告されており⁵⁻⁹⁾、当院でも1987年に初めて分離されて以来、1990年では19.6%、1992年では38.5%と急増の傾向を示している。また、本菌による化膿性髄膜炎^{7,8,10)}や肺炎による死亡例などが報告され¹¹⁾、治療上の問題となっている。乳幼児における本菌の感染症では、死亡率や後遺症発生率が高いことから、感染初期における適正な抗菌薬の選択が治療上もっとも重要である。しかし、臨床細菌検査では、検出菌は分離培養時に外観情報のみで推定判断し釣菌するため、他菌種と混在するPRSPの検出は困難であり、さらにPRSPとPSSPとの混在例は、検出できない可能性が高い。今回は、臨床材料からPRSPを確実に検出することを目的に、また同時にPRSPの可能性を迅速に疑える選択培地を試作した。本選択培地の選択剤としてMPIPCを用いたが、PCGは培地中に添加後の安定性が短期間であり、実用性に乏しかったため安定性が高くかつ*S. pneumoniae*に対するMIC値がPCGとの相関性が高いMPIPCを代用することにより、42日間培地中での安定性が得られた。PRSP-SMは、MPIPC 0.1 mg/l, GM 5 mg/l, AZT 10 mg/lを添加することにより、大部分のグラム陰性菌群と約60%の*S. aureus*を発育阻止するため、比較的*S. pneumoniae*と同時に検出されることが多い*P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *S. aureus*, *B. catarrhalis*を発育阻止するとともに、約80%のPSSPも発育阻止するため、臨床検体を直接塗布した場合、翌日に耐性株存在の疑いが推定できた。また、実例として同一喀出痰で非選択培地上のPSSPが 6×10^7 CFU/ml検出された検体中に、PRSPが 1×10^6 CFU/ml検出された例や、PSSPが 1×10^6 CFU/ml中にPRSPが 5×10^5 CFU/ml検出された例などが確認された。このように、同一検体

中の同一菌種に、薬剤感受性の異なる菌株が混在する例において、耐性株の存在を証明することは特定の抗菌薬を特定濃度添加した選択培地を用い検体を直接塗布しないと検出はきわめて困難である。従来の分離培地上に発育したコロニーの外観情報のみから1~2株を釣菌し実施する薬剤感受性試験では、釣菌した菌株についての薬剤感受性成績しか得ることができず、検体全体を対象とする耐性株の存在を証明することはできない。したがって、乳幼児の肺炎、敗血症、化膿性髄膜炎など本菌種を強く疑う場合、PRSP-SMを使用することにより、PRSPを迅速かつ確実に検出することは、治療学上重要であると思われる。

文 献

- 1) Hansman D, Bullen M M: A resistant pneumococcus. *Lancet*: 264~265, 1967
- 2) Difco Manual, 9th ed, Detroit; Difco Laboratories, 1953, P 287.
- 3) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告(1989) (委員長: 五島瑛智子): 微量液体希釈法によるMIC測定(微量液体希釈法) - 日本化学療法学会標準法一。 *Chemotherapy* 38: 102~105, 1990
- 4) Ward J: Antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*: clinical and epidemiologic aspect. *Rev. Infect. Dis.*, 3: 254~266, 1981
- 5) 松本慶蔵, 他: 病原性の明確な肺炎球菌の抗菌物質感受性と血清型別。 *Chemotherapy* 25: 2988~2992, 1977
- 6) 小栗豊子, 小酒井望: 臨床材料から分離した肺炎球菌の血清型と抗生物質感受性。 *Jap. Antibiotics* 34: 95~101, 1981
- 7) 水見京子, 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生剤感受性の検討。 *感染症学雑誌* 64: 725~732, 1990
- 8) 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。 *感染症学雑誌* 63: 189~196, 1989
- 9) 紺野昌俊, 他: 「ペニシリン耐性肺炎球菌研究会」; 全国各地で分離された肺炎球菌の疫学的研究。 *感染症学雑誌* 68: 1338~1351, 1994
- 10) 有益 修, 他: β -ラクタム剤が無効であった肺炎球菌髄膜炎の1例。 *感染症学雑誌* 62: 682~683, 1988
- 11) 重野秀明, 山崎 透, 永井寛之, 後藤陽一郎, 田代隆良, 那須 勝: β -ラクタム薬耐性肺炎球菌性肺炎で死亡した1症例と分離菌の耐性機序。 *感染症学雑誌* 66: 508~514, 1991

Development and evaluation of a new selective agar plate for penicillin-resistant pneumococci (PRSP)

Junichi Matsuda, Kazuyuki Sugawara, Ryoji Yoshida,
Kazunori Tomono and Mitsuo Kaku

Department of Laboratory Medicine Nagasaki University School
of Medicine, 1-7-1, Sakamoto, Nagasaki 852, Japan

Penicillin-resistant pneumococci (PRSP) have been increasing recently in our hospital. The percentages of penicillin-resistant strains in isolated pneumococci were 38.5% in 1992, 33% in 1993 and 34% in 1994. We developed a new selective agar plate for PRSP (PRSP-SM). Briefly, we added oxacillin (0.1 mg/l), aztreonam (10 mg/l) and gentamicin (5 mg/l) to Tripticase soy II agar supplemented with 5% sheep blood. In these agar plates, 100% (70/70) of PRP grew and 81% (91/112) of penicillin-sensitive pneumococci (PSSP) did not grow. However, some gram-negative rods (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Serratia marcescens*, *Xanthomonas maltophilia*) also grew. Antibiotics in the agar plates stored at 4°C were active enough for 42 days (oxacillin) or 90 days (aztreonam, gentamicin). In these agar plates, PRSP in the clinical samples grew by overnight incubation, however major contaminant organisms, *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Branhamella catarrhalis* and PSSP almost never grow.