

[原 著]

急性中耳炎例の中耳貯留液から分離された肺炎球菌の莢膜型と薬剤耐性遺伝子解析

黒川いく¹⁾・真崎純子¹⁾・千葉菜穂子²⁾・生方公子²⁾¹⁾ 労働者健康福祉機構 東北労災病院 検査科²⁾ 北里大学北里生命科学研究所 病原微生物分子疫学研究室

(平成 20 年 8 月 12 日受付, 平成 20 年 12 月 24 日受理)

2006 年 8 月から 2007 年 5 月までに東北労災病院耳鼻咽喉科を受診し, 急性中耳炎 (AOM) と診断され, 鼓膜切開術が施行されて採取された中耳貯留液 462 検体を対象とした。190 株 (41.1%) の菌が分離され, このうち 75 株 (39.5%) が *Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌) と同定された。75 株について, 薬剤耐性化にかかわる遺伝子解析を実施した。*pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b* の 3 遺伝子に変異をもたない genotype (g) PSSP (gPSSP) は 6 株 (8.0%), *pbp2x*, *pbp2b*, *pbp2x+2b*, あるいは *pbp1a+2x* 変異の gPISP が 36 株 (48.0%), 3 遺伝子に変異を認める gPRSP は 33 株 (44.0%) であった。マクロライド耐性遺伝子は, *erm(B)* 保有が 46 株 (61.3%), *mef(A)* 保有が 23 株 (30.7%), 耐性遺伝子を保有しない株はわずか 3 株 (4.0%) のみであった。莢膜血清型は, 3 (25.3%) > 19F (18.7%) > 6A (16.0%) > 14 (9.3%) = 23F (9.3%) の順が多かった。これらの菌株のうち, ムコイドの性状を示す 3 型 (*pbp2x* 変異株) と極小コロニーを呈する 14 型菌 (*pbp1a+2x* 変異株) における penicillin G 感受性は, 日常業務の微量液体希釈法ではいずれも $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$ 以下と判定されていた。感受性測定時における接種菌量や培地の再検討が必要であると結論された。

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, serotype, penicillin-binding protein genes, acute otitis media

I. はじめに

急性中耳炎 (AOM), あるいは急性副鼻腔炎は, 耳鼻咽喉科領域においては極めてポピュラーな感染症であり, その主たる起炎菌としては *Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌), *Haemophilus influenzae* (インフルエンザ桿菌), そして *Moraxella catarrhalis* (モラキセラ菌) が重要視されている。その中でも, 肺炎球菌による場合に炎症所見が強いとされる。肺炎球菌においては, 1977 年にペニシリン耐性肺炎球菌 (penicillin-resistant *S. pneumoniae*; PRSP) が世界で初めて報告¹⁾されたが, 我が国においては, 1980 年代後半から重症感染症例より PRSP が分離され始めた²⁾。耳鼻咽喉科領域では 1989 年以降, PRSP による難治性,

あるいは反復性の中耳炎例が増加してきた³⁾。

AOM は, 乳幼児に最も多く見られる上気道感染症の一つで, 生後 3 歳までの間に 50~70% の児が少なくとも 1 回は罹患するといわれる⁴⁾。本症は PRSP が原因菌として問題視される以前は, ペニシリン系薬の短期間投与で比較的容易に治癒させることができたこととされ, 入院による加療を必要とする例はまれであった。しかし, 耐性菌の増加により, 中耳という薬剤が浸透しにくい部位の炎症であることから, 鼓膜切開術の施行や入院による注射薬での加療が必要な症例が明らかに増加している⁵⁾。

一方, AOM の検体としては, 鼓膜切開液, 鼓膜穿刺液, あるいは耳漏が採取されて細菌検査用に提出されるが, 原因菌を推定するうえでは前二者が望ましい。耳漏は外耳道の常在細菌で汚染されやすく, 必ずしも適切な検査材料ではないとされる。そのようなことから本研究においては, 当病院の耳鼻咽喉科外来を受診し, AOM と診断された症例から採取された中耳貯留液由来の肺炎球菌について, i) β -ラクタム系薬の感受

著者連絡先: (〒981-8563) 仙台市青葉区台原 4-3-21
労働者健康福祉機構 東北労災病院 検査科
黒川いく
TEL: 022-275-1507
FAX: 022-275-1350
E-mail: ikukuro@ma.mni.ne.jp

性にかかわる PBP 酵素をコードする *pbp* 遺伝子とマクロライド系薬耐性遺伝子の解析, ii) penicillin G (PCG) の薬剤感受性と *pbp* 遺伝子との関連, iii) 病原性と関連する莢膜型と耐性との関係, iv) 治療抗菌薬の実態, について検討したので報告する。

II. 材料と方法

1. 被験菌株

2006年8月から2007年5月までの間に、東北労災病院耳鼻咽喉科外来を受診し、AOMと診断され、鼓膜切開術が必要と判断されて施行された462症例からの中耳貯留液が対象とされた。中耳貯留液の採取にあたっては、滅菌吸引瓶を用いて可能な限り十分量の貯留液が採取できるように工夫した。採取後は、直ちにシードスワブγ2号‘栄研’（栄研化学(株)）に吸収させ、当検査室に提出された。血液寒天培地（血液寒天培地（ウマ）、極東製薬工業(株)）とチョコレート寒天培地（BY Chocolate Agar, 日本BD社）に白金耳で塗り広げた。被験各培地は18~24時間、35℃、5%炭酸ガス培養を行った。血液寒天培地上でα溶血を示すコロニーを血液寒天培地に塗り広げ、オプトヒンディスク‘栄研’（栄研化学(株)）を載せ18~24時間好気培養後、13mm以上の阻止円が形成された株を肺炎球菌と同定した。最終的に75株の肺炎球菌が分離・同定され、それらはマイクロバンク（アスカ純薬(株)）にて用時まで-80℃に保存された。

2. 薬剤耐性遺伝子解析と莢膜型別

分離した75株の肺炎球菌については、北里大学北里生命科学研究所、病原微生物分子疫学研究室に出向き、菌種同定のための *LytA* 遺伝子、ペニシリン結合タンパク質 (penicillin-binding protein; PBP) をコードする *pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b* 遺伝子変異の有無と、マクロライド耐性遺伝子 *mef(A)* および *erm(B)* の有無について、ペニシリン耐性肺炎球菌遺伝子検出試薬（湧永製薬(株)）を用い、プロトコールに従って解析した。

また、それぞれの菌株の莢膜型は、型別用抗血清 (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) を用いて莢膜膨化試験により判定した。

3. PCGの感受性検査

75菌株に対するPCGの最小発育阻止濃度(MIC)は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 準拠の微量液体希釈法⁶⁾（ドライプレート‘栄研’ 栄研化学(株)）を用い、プロトコールに従って測定した。その他に、北里大学にて寒天平板希釈法によりPCG感受性を再度測定した。

なお、CLSIの肺炎球菌に対する感性(S)/耐性(R)のブレイクポイント(BP)は、2008年1月に改訂版が出版された⁷⁾。すなわち、注射薬のブレイクポイント(BP)、化膿性髄膜炎でのBP、そして経口抗菌薬のBPと、より詳細な記述へと変更されている。臨床的には、注射薬では高い血中濃度が得られることを反映し、PCGを基準にすると髄膜炎以外では、 $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ がR、化膿性髄膜炎では $\geq 0.125 \mu\text{g/ml}$ はR、経口抗菌薬では $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ をRと判断するよう記載されているが、本研究においては菌株の収集と解析が2007年までであったため、改訂前の勧告に準じた。

4. 治療薬の調査

肺炎球菌が分離されたAOMの各症例について、i) 性別, ii) 年齢, iii) 基礎疾患の有無, iv) 検査材料採取前の2週間以内における抗菌薬使用の有無とその種類, v) 外来または入院による治療か否か、それぞれの担当医に記入を依頼する調査票形式で実施した。

III. 結果

1. 肺炎球菌陽性例の年齢分布と *pbp* 遺伝子型

培養検査が実施された中耳貯留液462検体から190菌株(41.1%)が分離された。その内訳は、肺炎球菌が75株(39.5%)、インフルエンザ桿菌が73株(38.4%)、モラクセラ菌が19株(10.0%)であった。その他に、coagulase negative *Staphylococcus* species が6株、*Staphylococcus aureus* (MSSA)、*Streptococcus pyogenes*、*Corynebacterium* spp. が各2株であった。

これらのうち、肺炎球菌75株の *pbp* 遺伝子解析に基づいて区別した genotype (g) 型と、症例の年齢との関係を図1に示す。75株の男女比は、男性40例(53.3%)、女性35例(46.7%)であった。年齢分布で最も症例数が多かったのは1歳の27株(36.0%)、次いで7~11カ月の12株(16.0%)であった。2歳以上6歳までの症例数は暫時減少し、7歳以上の症例は全体の12%であった。つまり、1歳以下が全体の52%、3歳までが全体の78.7%を占めていた。

遺伝子型ではgPRSP (*pbp1a+2x+2b*) が33株(44.0%)と最も多く、次いでgPISP (*pbp2x*) が22株(29.3%)、gPISP(*pbp1a+2x*) とgPSSPがそれぞれ6株(8.0%)ずつ認められた。また、乳幼児ほど耐性菌の多い傾向が認められた。遺伝子型の特徴は後述する莢膜型と関係しているが、gPISP(*pbp2x+2b*)、あるいはgPISP(*pbp2b*) タイプは2歳以上で分離されていること、成人ではgPISP(*pbp2x*) であることが注目された。

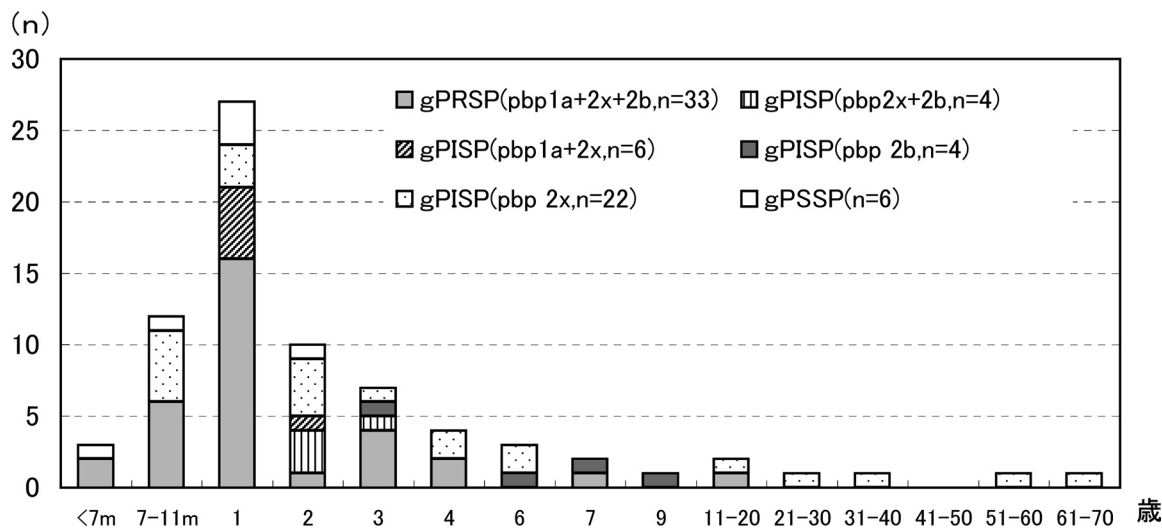


図1. 中耳貯留液由来肺炎球菌の患者年齢と *pbp* 遺伝子変異

2. PCG 感受性と *pbp* 遺伝子型の関係

図2aには、微量液体希釈法によって日常業務の中で測定された感受性成績と *pbp* 遺伝子変異との関係、図2bには後日寒天平板希釈法で測定された感受性成績と *pbp* 遺伝子変異との関係を示す。BPは、 $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$ をPSSP(S)、 $0.125 \sim 1.0 \mu\text{g/ml}$ をPISP(I)、 $\geq 2.0 \mu\text{g/ml}$ をPRSP(R)とした。

微量液体希釈法と遺伝子変異との関係を見ると、“R”はすべてgPRSP、“I”の78%はgPRSPであったものの、その他にgPISPも含まれていた。gPSSPの1株のみが $0.25 \mu\text{g/ml}$ で“I”に判定されていた。“S”にはgPSSP、gPISP(*pbp2x*)、gPISP(*pbp1a+2x*)が含まれ、gPRSPも1株存在した。

他方、寒天平板希釈法では微量液体希釈法に比べ、全体的に試験管で1管耐性側のMICを示した。また、遺伝子学的に区別された株のMICは、それぞれ試験管3管以内におおむね収まっていた。

微量液体希釈法と寒天平板希釈法の成績で最も乖離が見られたのは、gPISP(*pbp2x*)とgPISP(*pbp1a+2x*)であった。前者のほとんどはムコイド型のコロニーで自己融解が速く進行する株が多く、後者は後述する莢膜14型で極めて小さいコロニーを形成する発育の遅い株であった。

3. マクロライド系薬耐性遺伝子の有無と *pbp* 遺伝子との関連

マクロライド耐性遺伝子の保有状況は表1に示す。23Sリボソームをジメチル化し、菌をマクロライド系薬に高度耐性化させる *erm*(B) 遺伝子保有株が46株

(61.3%)、薬剤排出にかかわる *mef*(A) 遺伝子保有株が23株(30.7%)、両遺伝子保有株が3株認められた。マクロライド耐性遺伝子を保有しない株はわずか3株(4.0%)にすぎなかった。

pbp 遺伝子型との関係を見ると、gPISP(*pbp2x*)の22株中21株は *erm*(B) 保有株、gPRSP株は33株中20株が *mef*(A) 遺伝子保有株、9株が *erm*(B) 保有株であった。

4. 莢膜血清型と耐性との関係

図3には、病原性と関連する莢膜血清型と *pbp* 遺伝子型との関係を示す。75株中最も多かったはムコイド株の多い3型で19株(25.3%)、次いで19F型の14株(18.7%)、6A型の12株(16.0%)、14型と23F型の各7株(9.3%)、6B型5株、12型4株であった。

特に、3型はすべての株がgPISP(*pbp2x*)株であった。また、19F、23F、6B型の計26株は、すべてgPRSPであった。また、14型はgPISP(*pbp1a+2x*)、12型はgPISP(*pbp2b*)であることが注目された。

ちなみに、小児を対象とした7価 conjugate vaccine (7PCV: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23Fをカバーする)のこれらの菌株に対するカバー率は46.7%と低かった。

5. 肺炎球菌陽性例に対する治療抗菌薬

診断名の詳細は、AOMのみが58例、急性副鼻腔炎を併発していた症例が11例、扁桃炎、咽頭炎などの併発例が6例であった。基礎疾患を有していた症例は認めなかった。

また、当病院耳鼻咽喉科にて鼓膜切開術を施行する

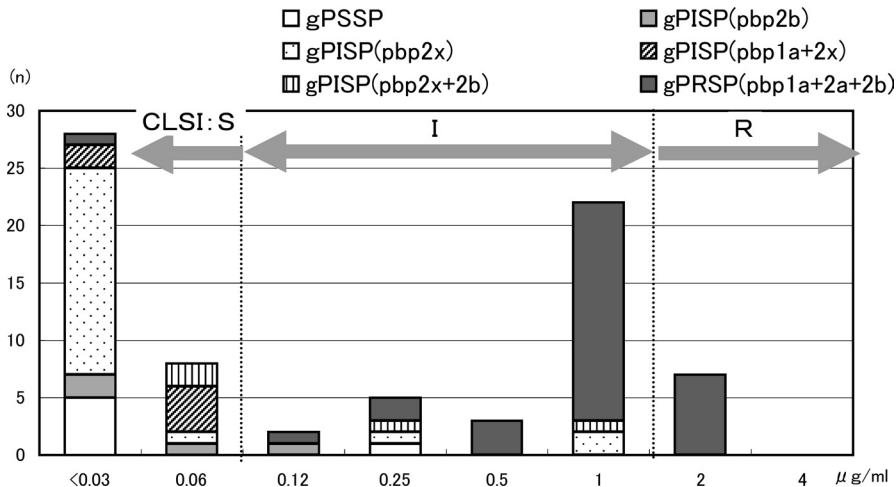


図 2a. 微量液体希釈法での penicillin G 感受性と *pbp* 遺伝子変異との関係

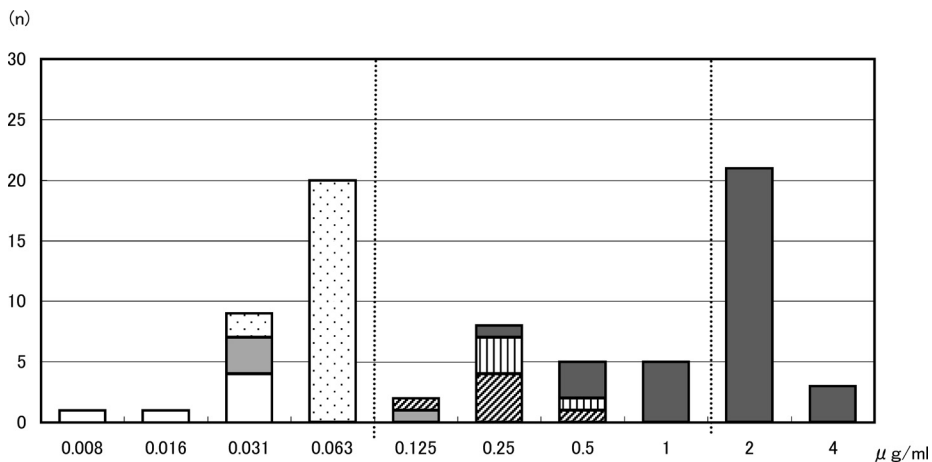


図 2b. 寒天平板希釈法での penicillin G 感受性と *pbp* 遺伝子変異との関係

前の 2 週間以内に、抗菌薬投与を受けていた症例は、75 症例中 28 例 (37.3%)、その内訳は cefditoren (CDTR) が 10 例、amoxicillin (AMPC) が 5 例などであった。

鼓膜切開術施行後、入院による加療を有した例は 43 例 (57.3%) 認められたが、成人 4 例を除く症例の平均年齢は 2.2 歳 (4 カ月~11 歳) であった。治療には panipenem/betamipron (PAPM) が 27 例 (62.8%) に使用されていた。

他方、外来での治療例は 32 症例認められたが、治療用経口薬としては clavlanic acid/amoxicillin (CVA/AMPC: 平均 96.4 mg/kg, 分 2) が 19 例 (59.4%), AMPC (平均 50 mg/kg, 分 3) が 10 例

(31.3%), CDTR (平均 3 mg/kg, 分 3) が 2 例 (6.3%) に使用され、治療後来院しなかった 1 例を除き 31 症例の治療を確認している。

なお、耐性菌の分離と抗菌薬の前投与歴との関係を調べると、投与歴ありの 28 例中 57.1% ($n=16$) から gPRSP が分離され、投与歴なしの 47 例中 36.2% ($n=17$) に比して、有意差は見いだせなかったものの、その分離頻度には高い傾向が認められた ($\chi^2=3.1322$, $p=0.0768$)。

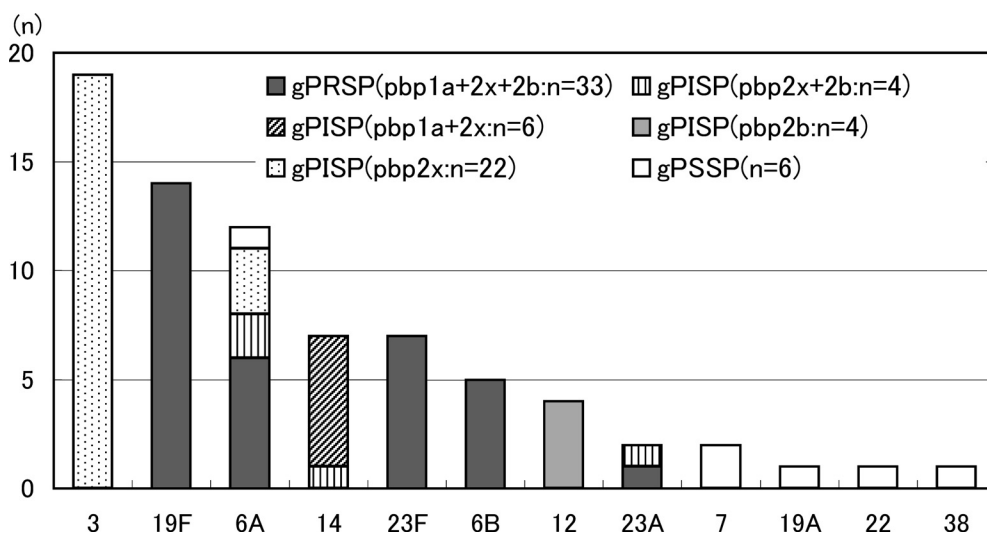
IV. 考 察

小児の肺炎球菌による AOM は、近年、難治性、あるいは反復化が問題視されている³⁾。治療に難渋し、

表 1. 中耳貯留液由来肺炎球菌の *pbp* 遺伝子変異とマクロライド耐性遺伝子保有との関係

Macrolide resistance gene	gPSSP	gPISP				gPRSP (<i>pbp1a+2x+2b</i>)	計
		<i>pbp2x</i>	<i>pbp2b</i>	<i>pbp1a+2x</i>	<i>pbp2x+2b</i>		
Negative	2 (2.7)					1 (1.3)	3 (4.0)
<i>mef</i> (A)	1 (1.3)	1 (1.3)			1 (1.3)	20 (26.7)	23 (30.7)
<i>erm</i> (B)	3 (4.0)	21 (28.0)	4 (5.3)	6 (8.0)	3 (4.0)	9 (12.0)	46 (61.3)
<i>mef</i> (A)+ <i>erm</i> (B)						3 (4.0)	3 (4.0)
計	6 (8.0)	22 (29.3)	4 (5.3)	6 (8.0)	4 (5.3)	33 (44.0)	75 (100.0)

() 内には%を示す。

図 3. 中耳貯留液由来肺炎球菌の莢膜血清型と *pbp* 遺伝子変異との関係

入院加療を余儀なくされる症例も多いといわれる。AOM に対する処置として行われる鼓膜切開術は、i) 38℃以上の発熱や疼痛、ii) 不機嫌などの臨床症状、iii) 2歳以下、iv) 鼓膜膨隆所見、v) 初期治療抗菌薬への反応不良時などに早期に実施すべきとされる²⁾。今回対象とした肺炎球菌株は、すべて鼓膜切開術後に採取された中耳貯留液由来であったが、当病院の特徴として「小児急性中耳炎の診療ガイドライン」⁷⁾ (ガイドライン) の重症度判定で重症に分類される症例が多かったと推定される。

PBP の遺伝子解析では gPRSP は 44.0% と多かったが、gPISP も 48.0% 認められ、特に *pbp2x* 単独変異株が依然として 29.3% を占め、既報⁸⁾ と変わらなかった。神谷らの最近の成績でも、小児 AOM 例から分離された肺炎球菌の遺伝子解析において、gPSSP は 12.9%、gPISP は 34.8%、gPRSP は 52.2% であっ

たが、微量液体希釈法では PSSP は 40.3%、PISP は 42.8%、PRSP は 16.9% となったことを報告している⁹⁾。

問題は、分離された肺炎球菌の遺伝子型と感受性測定結果との関係である¹⁰⁾。微量液体希釈法と寒天平板法での MIC とを比較をすると、全体的に微量液体希釈法では試験管 1 管程度感性側へ判定される傾向にあったが、特にムコイド株の gPISP(*pbp2x*) 株と gPISP(*pbp1a+2x*) 株で MIC が $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$ と判定されていた。これらの遺伝子型の菌は、本邦で使用頻度の高いセフェム系薬に 0.25~0.5 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示すことが特徴である。つまり、検査報告において“PSSP”と報告した場合には、その成績をもとに経口セフェム系薬が選択され投与される可能性がある。しかし、経口セフェム系薬に対する PK/PD からは、臨床効果は十分に得られないことも推定される。

一方、測定法の問題としては、微量液体希釈法と寒天平板法での MIC の乖離が見られたことである。その一因として、莢膜 3 型のムコイド菌は、菌液調整を規定の OD に調整しても溶菌が進行して生菌数が少ないこと、また、コロニーが非常に小さい 14 型は発育が極めて遅いため生菌数が少ないのではないかと考えている。これらの乖離を小さくするためには、接種菌量が適正であったか否かの確認が必要であることを痛感すると同時に、市販の感受性測定培地においても、使用にあたってのさらなる最適化されたプロトコルが必要であろう。

マクロライド耐性遺伝子保有状況については、*erm(B)*, あるいは *mef(A)* 遺伝子を保有する株は 96.0% も認められ、宇野や¹²⁾ 神谷ら⁹⁾ の報告よりさらに増加しており、治療薬としてはほとんど抗菌力を失っていると考えられた。

PBP の遺伝子変異と莢膜型との関係では、19F, 23F, 6B 型には gPRSP, 3 型には gPISP(*pbp2x*), 14 型には gPISP(*pbp1a+2x*), 12 型は gPISP(*pbp2b*) の多いことが注目された。耳漏、鼓膜切開液由来株では、他の検体に比して 3 型の割合が高いことがすでに指摘されている^{9,11)} が、私どもの成績ではさらに 3 型菌が多かった。従来、3 型は乳突蜂巣炎などの重篤な疾患を惹起することが知られ、14 型は世界的には侵襲性感染症を惹起する頻度が最も高い型であるとされている。

一般病院の検査室で莢膜型を日常的に調べることは困難であるが、ムコイド株は培地上のコロニー形態から確認できるため、臨床側へは積極的にその情報を提供するべきであろう。

最後に治療薬であるが、鼓膜切開術後に外来治療が行われた 28 例には、1 例の ABPC 点滴例以外は、ガイドラインで推奨される CVA/AMPC, AMPC, CDTR の 3 抗菌薬のいずれかが投与されていた。しかし、入院加療となった 43 例では、ガイドライン推奨の ABPC, ceftriaxone (CTRX) の点滴は 7 例のみで、PAPM が 27 例、meropenem (MEPM) が 3 例に使用されていた。実際、PAPM 使用の 27 例中 13 株は、寒天平板法による ABPC の MIC が $2\mu\text{g/ml}$ 以上で、推奨抗菌薬よりも殺菌性に優れた薬剤が選択されたものと考えられた。MEPM が選択された例は、中耳貯留液と同時に採取された鼻汁吸引液からインフルエンザ菌も検出されていた症例であった。これらの実態は重症例での治療の困難さを示していると思われた。

現在、小児の AOM については、診療ガイドライン⁷⁾や 7 価ワクチンの導入への動きなど態勢が整えられつつある。しかし、AOM は乳幼児に多いこと、集団

保育や感染の繰り返し、抗菌薬の投与既往歴などは治療上のリスクファクターと考えられ、耐性菌が 50% 近くに達した今日、難治例をコントロールするのはかなり難しいといわれる。再発・再燃例を極力少なくするためには、検査側はその検査精度を高め、臨床側へ提供する責務を負っている。そのためにも、微量液体希釈法による感受性測定のさらなる適正化についての検証が必要であると考えられる。

謝 辞 本研究における患者情報、使用抗菌薬調査にご協力いただきました東北労災病院耳鼻咽喉科 沖津尚弘先生に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Jacobs, M. R., H. J. Koornhof, Robins-Browne, et al. 1978. Emergence of multiply resistant pneumococci. *N. Engl. Med.* 299: 735-740.
- 2) 紺野昌俊, 生方公子. 1999. 改訂ペニシリン耐性肺炎球菌, 協和企画通信, 東京.
- 3) 山中 昇, 保富宗城. 2003. 難治化する急性中耳炎. *感染症誌* 77: 595-605.
- 4) Teele, D. W., J. O. Klein, B. Rosner. 1989. Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in children in greater Boston: A prospective, cohort study. *J. Infect. Dis.* 160: 83-94.
- 5) 遠藤廣子. 2000. 呼吸器系感染症に対する抗菌薬の使い方. *小児内科* 32: 215-222.
- 6) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard edition; CLSI document M7-A7, CLSI, Wayne, PA.
- 7) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; Eighteenth Informal Supplement M100-S18, CLSI, Wayne, PA.
- 8) 日本耳科学会・日本小児耳鼻咽喉科学会・日本耳鼻咽喉科感染症研究会小児急性中耳炎診療ガイドライン 2006 年版. 金原出版, 2006.
- 9) 神谷 齊, 加藤達夫. 2007. 小児急性化膿性中耳炎における肺炎球菌血清型に関する疫学調査. *感染症誌* 81: 59-66.
- 10) 藤原啓次, 保富宗城. 2007. 中耳炎に対する抗菌薬投与方法の基本的な考え方. *日化療会誌* 55: 201-210.
- 11) 生方公子, 小林玲子. 2003. 本邦において 1998 年から 2000 年の間に分離された *Streptococcus pneumoniae* の分子疫学解析. *日化療会誌* 51: 60-70.
- 12) 宇野芳史. 2004. 小児急性中耳炎症例の鼻咽頭から検出された *Streptococcus pneumoniae* の分子遺伝学的検討. *日化療会誌* 52: 68-74.

Serotype Distribution and Penicillin-Binding Protein Genes of *Streptococcus pneumoniae* Isolated from the Patients with Acute Otitis Media

Iku Kurokawa,¹⁾ Junko Masaki,¹⁾ Naoko Chiba,²⁾ Kimiko Ubukata²⁾

¹⁾ Department of Laboratory Medicine, Tohoku Rosai Hospital, Japan Labor Health & Welfare Organization, 4-3-21 Dainohara, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 981-8563, Japan

²⁾ Kitasato Institute for Life Science & Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University

We studied 426 acute otitis media (AOM) cases for the period from August 2006 to May 2007. Specimens were collected by myringotomy, and 190 (41.1%) strains were isolated, in which 75 isolates were identified as *Streptococcus pneumoniae*. Abnormal PBP genes of *pbp1a*, *pbp2x*, and *pbp2b* were identified by PCR as follows: (i) genotype (g) PSSP with normal PBP gene (8.0%), (ii) gPISP with an abnormal *pbp2x* gene (29.3%), (iii) gPISP with an abnormal *pbp2b* gene (5.3%), (iv) gPISP with an abnormal *pbp2x+2b* gene (5.3%), (v) gPISP with an abnormal *pbp1a+2x* gene (8.0%), and (vi) gPRSP with an abnormal *pbp1a+2b+2x* (44.0%) gene. Pneumococcal serotype of isolates were 3 (25.3%), 19F (18.7%), 6A (16.0%), 14 (9.3%), and 23F (9.3%). The MICs value of PCG in serotype 3 strains with *pbp2x* (mucoid type) or serotype 14 strains with *pbp1a+2x* demonstrating small colonies were considered to be $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$ by dilution antimicrobial susceptibility methods commonly used in our daily laboratory work. It is concluded that we need to re-examine the conditions of bacterial inoculum size and the medium at the time of measurement of susceptibility.