

[原 著]

新しいキノロン薬の肺炎球菌に対する抗菌活性の比較
—ペニシリン・マクロライド・キノロン薬における感受性相関を含めて—

福澤 滋¹⁾・舘田一博^{1,2)}・石井良和^{1,2)}・榎園恭子¹⁾・彦坂あゆみ¹⁾・渋谷理恵²⁾
前原千佳子¹⁾・村上日奈子¹⁾・安井久美子¹⁾・湯本重雄¹⁾・岩田守弘¹⁾・山口恵三^{1,2)}

¹⁾ 東邦大学医療センター大森病院 微生物検査室

²⁾ 東邦大学医学部 微生物・感染症学講座

(平成 20 年 2 月 29 日受付, 平成 21 年 1 月 14 日受理)

当施設で分離された *Streptococcus pneumoniae* 356 株を対象に, 近年臨床応用されたレスピラトリーキノロン薬 moxifloxacin (MFLX), garenoxacin (GRNX) および開発中の sitafloxacin (STFX), DX619 を含め, キノロン系抗菌薬の *S. pneumoniae* に対する抗菌活性を比較検討した。今回検討した *S. pneumoniae* の約 60% の株が penicillin G (PCG) に対して低感受性を示した。一方, マクロライド系およびケトライド系抗菌薬においては, 264 株 (74.2%) が clarithromycin (CAM) に耐性, telithromycin (TEL) に対しても MIC 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の低感受性を示す株が 9 株 (2.5%) 認められた。キノロン薬の MIC₉₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$) は低いものから DX619 (≤ 0.031), GRNX (0.063), STFX (0.063), tosufloxacin (TFLX) (0.25), MFLX (0.25), gatifloxacin (GFLX) (0.5), levofloxacin (LVFX) (1), ciprofloxacin (CPFX) (2), pazufloxacin (PZFX) (2) の順であった。LVFX, TEL にそれぞれ 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の低感受性を示した 12 株, 9 株を対象にパルスフィールド電気泳動を実施したところ, 散発的な同一クローンの分離は見られたものの, 単一クローンの広範な伝播は確認されなかった。新しいレスピラトリーキノロン薬は *S. pneumoniae* に対してさらに強い抗菌活性を有するものの, これら薬剤に対する耐性菌の出現には十分注意して対応していく必要があると考えられた。

1. 序 文

肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) は, ブドウ球菌とならびヒトに対して病原性の強いグラム陽性球菌であり, 感染症原因菌としてもっとも頻回に分離される細菌の一つである。*S. pneumoniae* が原因となる感染症としては肺炎・中耳炎・副鼻腔炎などの呼吸器・耳鼻科領域感染症, 髄膜炎, 敗血症などの全身感染症が重要である。特に市中肺炎では, 報告地域・国にかかわらず *S. pneumoniae* が原因菌の第 1 位であり, 症例全体の 20~40% が本菌肺炎であることが報告されている^{1,2)}。また, 成人の髄膜炎症例においても *S. pneumoniae* によるものが約 30~40% で第 1 位³⁾, 小児細菌性髄膜炎では *Haemophilus influenzae* と並び

本菌が 2 大原因菌の一つとなっている。

1980 年代までは, 肺炎球菌感染症に対する抗菌薬療法としてはペニシリン系抗菌薬 (特に penicillin G: PCG) が第一選択剤であった。しかし最近になって, 肺炎球菌感染症に対する抗菌薬療法が変化しつつある。ペニシリン低感受性すなわち, ペニシリン耐性・中等度耐性株 (penicillin-resistant *S. pneumoniae*; PRSP, penicillin-intermediate *S. pneumoniae*; PISP) の出現である。今日, *S. pneumoniae* の PCG に対する耐性化はさらに進行しており, 最近では *S. pneumoniae* の 50~60% が PCG に耐性あるいは中等度耐性を示すという事実が報告されている⁴⁾。また, PCG 低感受性株の多くがマクロライド薬, minocycline (MINO) などの薬剤に対しても耐性を獲得しており, いわゆる “多剤耐性肺炎球菌 (multi-drug resistant *S. pneumoniae*; MDRSP)” が臨床で大きな問題となっている⁵⁾。

このような状況の中で, *S. pneumoniae* に対する抗菌活性を高め, しかも肺への移行性に優れたキノロン

著者連絡先: (〒143-8540) 東京都大田区大森西 5-21-16
東邦大学医学部 微生物・感染症学講座
舘田一博
TEL: 03-3762-4151 (内線 2396)

薬、いわゆる“レスピラトリーキノロン”の開発が進んでいる。この中には levofloxacin (LVFX), tosofloxacin (TFLX), sparfloxacin (SPFX), gatifloxacin (GFLX) などがあり、さらに最近になって moxifloxacin (MFLX), garenoxacin (GRNX) が臨床応用されるに至っている。特に後 2 剤の *S. pneumoniae* に対する抗菌活性は強く、さらに sitafloxacin (STFX) や DX619 などの薬剤も開発中である。

今回、東邦大学医療センター大森病院で分離された *S. pneumoniae* 356 株を対象に、これらキノロン系抗菌薬の抗菌活性を比較するとともに、ペニシリン耐性・マクロライド耐性とキノロン感受性との関連およびパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による遺伝的背景の解析を行ったので報告する。

2. 材料と方法

対象とした *S. pneumoniae*: 2002~2004 年に当施設で臨床材料から分離された *S. pneumoniae* 356 株を対象に検討した。分離菌の同定は血液寒天培地 (日水製薬) 上で α 溶血を示すグラム陽性球菌を対象に、オプトヒン (栄研化学) 感受性および VITEK2 (日本ビオメリュー) により *S. pneumoniae* と同定された株を使用した。

抗菌薬感受性試験: Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) が定める微量液体希釈法に準じ最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した⁶⁾。

使用抗菌薬: PCG, clarithromycin (CAM; 大正製薬), telithromycin (TEL アベンティス ファーマ) に加え、キノロン系抗菌薬として LVFX (第一三共), TFLX (富山化学工業), GFLX (杏林製薬), ciprofloxacin (CPFX; バイエル), pazufloxacin (PZFX; 富山化学工業), MFLX (バイエル), GRNX (富山化学工業), STFX (第一三共), DX619 (第一三共) の抗菌薬感受性を測定した。

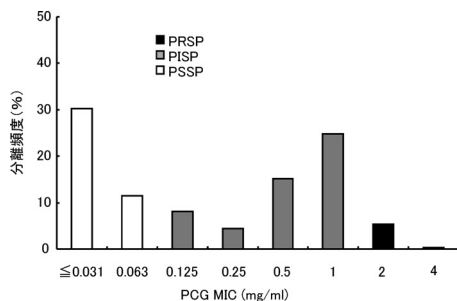


図 2. PCG, CAM の肺炎球菌に対する抗菌活性

PFGE による遺伝的背景の解析: 抗菌薬感受性試験において LVFX, TEL にそれぞれ 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の低感受性を示した株を対象に PFGE を施行し、遺伝学的同一性について検討を加えた。PFGE は以下に示す定法に従って実施した。すなわち、供試菌株は 10% ウシ胎児血清加 Todd Hewitt broth で 35°C にて一夜、静置培養後、アガロースプラグに包埋した。プラグを溶菌およびタンパク質分解処理後に得られたゲノムは *Sma*I にて消化し、CHEF Mapper (Bio-Rad) にて電気泳動を行った。泳動後のゲルは臭化エチジウムで染色し、紫外線ランプ照射下、写真撮影を行った。バンドパターンは、Fingerprinting II (Bio-Rad) を用いて、各菌株間における similarity の算出および系統樹の作製を行った。

3. 結果

今回検討した *S. pneumoniae* 356 株において、キノロン薬の MIC₉₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$) は低いものから DX619 (≤ 0.031), GRNX (0.063), STFX (0.063), TFLX (0.25), MFLX (0.25), GFLX (0.5), LVFX (1), CPFX (2), PZFX (2) の順であった (図 1)。

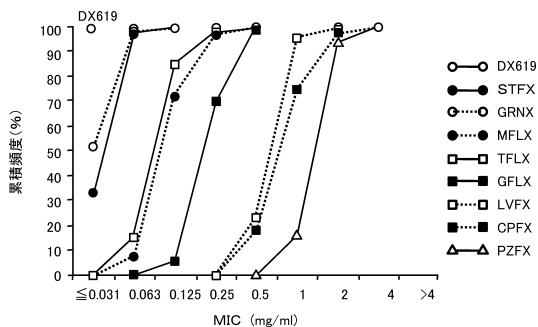
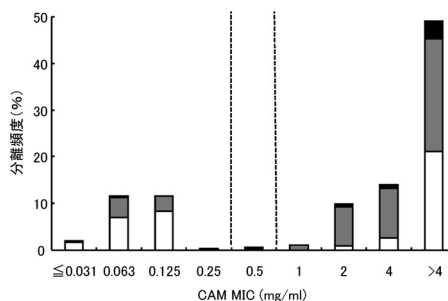


図 1. キノロン系抗菌薬の肺炎球菌に対する抗菌活性



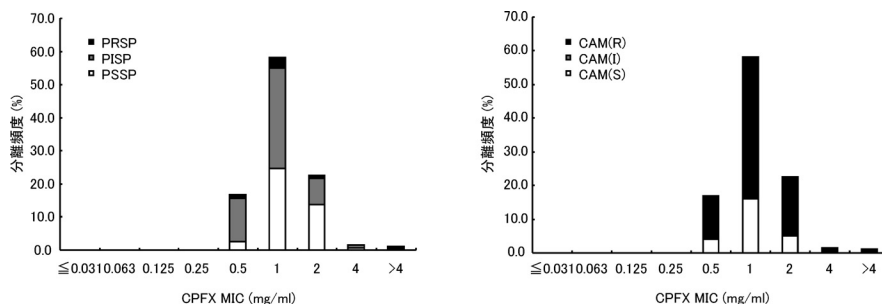


図3. PCG 耐性, CAM 耐性と CFX 感受性との関係

表1. LVFX, TEL に 2 µg/ml 以上の MIC を示した株が分離された症例の背景

菌株番号	PCG	CAM	TEL	LVFX	CFX	臨床的背景
L1	0.063	>4	0.125	2	4	耳鼻科 6歳 女子 02年8月採取(耳開放性)外来
L2	0.25	4	0.25	2	4	内科 74歳 男性 02年8月採取(喀痰)F病棟
L3	0.063	>4	1	>4	>4	
L4	0.5	>4	0.125	2	2	
L5	0.125	4	0.25	4	>4	内科 26歳 女性 03年1月採取(喀痰)外来
L6	≤0.031	>4	0.25	2	2	
L7	2	>4	0.25	>4	>4	
L8	1	>4	0.25	2	4	内科 71歳 男性 03年5月採取(喀痰)外来
L9	0.5	2	0.125	2	1	内科 72歳 男性 03年10月採取(喀痰)外来
L10	1	>4	0.125	2	4	内科 60歳 男性 04年1月採取(喀痰)外来
L11	0.5	2	0.063	2	2	内科 71歳 男性 04年2月採取(喀痰)C病棟
L12	≤0.031	>4	0.25	2	2	内科 72歳 男性 04年4月採取(喀痰)外来
T1	1	>4	2	1	1	小児科 3歳 女子 02年7月採取(鼻腔拭い)G病棟
T2	≤0.031	>4	2	1	1	
T3	≤0.031	>4	2	1	2	
T4	0.125	>4	2	0.5	0.5	内科 36歳 男性 02年11月採取(喀痰)A・B病棟
T5	0.125	>4	2	0.5	0.5	小児科 4歳 男子 03年2月採取(咽頭拭い)外来
T6	2	>4	2	1	1	小児科 7ヵ月 男子 03年2月採取(咽頭拭い)外来
T7	2	>4	2	1	1	内科 67歳 男性 03年3月採取(喀痰)D病棟
T8	0.125	>4	2	1	1	
T9	1	>4	2	1	2	小児科 4ヵ月 男子 04年4月採取(鼻腔拭い)E病棟

S. pneumoniae に対する PCG, CAM の抗菌薬感受性成績を(図2)に示した。PCGにおいて149株(41.9%)が0.063 µg/ml以下のMICを示したが、PISPが187株(52.5%), PRSPが20株(5.6%)認められ、全体で約60%の株がPCGに低感受性を示した。一方、マクロライド系およびケトライド系抗抗菌薬においては、264株(74.2%)がCAMに耐性、TELに対してもMIC 2 µg/mlの低感受性を示す株が9株(2.5%)見られた。また、ペニシリン耐性・マクロライド耐性とキノロン感受性の相関について検討したが、いずれにおいても明らかな相関は観察されなかった(図3)。

今回、LVFX, TEL にそれぞれ 2 µg/ml 以上の低感

受性を示す株が分離された症例の臨床的背景および分離菌のPFGE解析結果を示した(表1, 図4)。検討された21株において、T4-T5, L1-L8-L11, L2-L5-T7-T9, T1-T6-L10, L9-L12において80%以上の相同性が確認された。しかし、これらは、いずれも異なる病棟でかつ、同一外来であっても分離時期は最短でも数ヵ月離れており、院内における単一クローンの広範な伝播を示す所見は観察されなかった。

4. 考 察

1940年代に始まるPCGの臨床への導入後まもなくして、*S. pneumoniae* においても実験的に耐性菌が

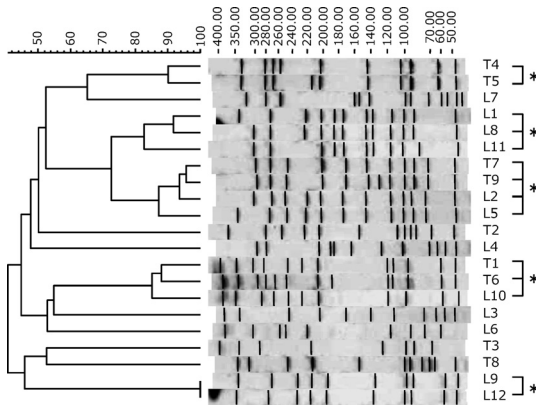


図4. LVFX, TEL に対して 2 mg/ml 以上を示した株を対象とした PFGE 解析結果
* 80%以上の相同性を示した菌株

出現することが確認されていた。1965年に Kislak らが初めて臨床材料から PCG 低感受性肺炎球菌を報告⁷⁾、その2年後にはオーストラリアの Hansman らが低 γ グロブリン血症患者から PCG の MIC が 0.6 $\mu\text{g/ml}$ を示す株の分離を報告している⁸⁾。1977年には南アフリカの Appelbaum らが多剤耐性肺炎球菌を分離しており、この株は PCG のみならず、セファロスポリン、マクロライド、テトラサイクリン、リファンピシン、ST 合剤などにも耐性を示した⁹⁾。その後、PCG 耐性肺炎球菌の分離頻度はヨーロッパ、北アメリカを中心に増加し、最近ではアジア、南アメリカ、アフリカなどの国々においても耐性菌分離頻度の上昇が報告されている。我が国では、小栗らが1981年に臨床材料から PCG 耐性肺炎球菌を分離し¹⁰⁾、その後耐性株による肺炎、髄膜炎症例が散発的に報告されている。さらに最近の検討では、*S. pneumoniae* の 50~60% が PCG に低感受性となっていることが報告されている。PCG 導入時期の本剤の MIC が 0.006~0.008 $\mu\text{g/ml}$ であったことを考えると、*S. pneumoniae* において PCG 耐性化が高まっていることになる。

S. pneumoniae における抗菌薬耐性の問題は、ペニシリン耐性からマクロライド耐性・テトラサイクリン耐性へとその耐性スペクトルを拡大している。図2の結果からも明らかなように、PCG に低感受性を示す株は CAM に対しても耐性化傾向が強く、PCG に低感受性を示す株の 80% 以上が本剤に耐性を獲得している。*S. pneumoniae* のマクロライド耐性は、薬剤排出機構 (efflux pump) あるいはメチル化酵素によるリボゾームの修飾を司る *mef* 遺伝子あるいは *erm* 遺伝子の

獲得により生じることが知られており、前者では軽~中度耐性、後者により高度耐性が誘導される^{11,12)}。また、*erm* 耐性を獲得している *S. pneumoniae* はマクロライド薬と同様に clindamycin (CLDM) に対しても同時に耐性を示す。一方、*S. pneumoniae* における PCG 耐性のメカニズムは、口腔内連鎖球菌におけるペニシリン結合タンパク質遺伝子の取り込みによるモザイク遺伝子の出現と考えられている。これは形質転換による外来遺伝子の取り込みによる耐性獲得であるが、同様の機序によってマクロライド耐性遺伝子の獲得が生じていることが推察される¹³⁾。

S. pneumoniae におけるキノロン耐性株の増加が欧米を中心に多数報告されているが、幸いにも本邦におけるその頻度は高くない。キノロン薬に対する *S. pneumoniae* の耐性機序は、本剤の作用点である DNA gyrase あるいは DNA topoisomerase IV の点突然変異の蓄積に伴うアミノ酸置換変異が原因となっている¹⁴⁾。現時点でのキノロン耐性頻度は高くないものの、その動向には十分に注意しておかなければならない。これは前述したように、ペニシリン耐性・マクロライド耐性が外来遺伝子の獲得によるものであるのに対し、キノロン耐性が点突然変異の蓄積による内因性耐性獲得であることと関連しているものと思われる。

今回の検討から、*S. pneumoniae* におけるペニシリン耐性・マクロライド耐性の蔓延が改めて確認されるとともに、少数ではあるが TEL, LVFX においても低感受性株が分離されていた。最近開発された MFLX, GRNX の抗肺炎球菌活性はたいへん優れているものの、それらに対する耐性菌の出現にも十分注意して対応していく必要があるであろう。

文 献

- 1) Niederman, M. S., L. A. Mandell, A. Anzueto, et al. 2001. Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy, and prevention. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163: 1730-1754.
- 2) Bartlett, J. G., S. F. Dowell, L. A. Mandell, et al. 2000. Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. *Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis.* 31: 347-382.
- 3) Durand, M. L., S. B. Calderwood, D. J. Weber, et al. 1993. Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N. Engl. J. Med.* 328: 21-28.
- 4) 近畿耐性菌研究会肺炎球菌抗菌薬サーベイランス

- グループ, 佐藤かおり, 小松 方, 島川宏一, 他. 2005. 近畿地区で分離された *Streptococcus pneumoniae* の抗菌薬耐性状況 (2003年~2004年) Jpn. J. Antibiotics 58: 221-229.
- 5) Van Bambeke, F., R.R. Reinert, P.C. Appelbaum, et al. 2007. Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* infections: Current and future therapeutic options. Drugs 67: 2355-2382.
- 6) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2006. Approved standard-seventh edition. M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
- 7) Kislak, J. W., L. M. Razavi, A. K. Daly, et al. 1965. Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. Am. J. Med. Sci. 250: 261-268.
- 8) Hansman, D., M. M. Bullen. 1967. A resistant pneumococcus. Lancet 2: 264-265.
- 9) Appelbaum, P. C., A. Bhamjee, J. N. Scragg, et al. 1977. *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. Lancet 2(8046): 995-997.
- 10) 小栗豊子, 小酒井 望. 1981. 臨床材料から分離した肺炎球菌の血清型別と抗生剤感受性. Jpn. J. Antibiotics 34: 95-105.
- 11) Calatayud, L., C. Ardanuy, E. Cercenado, et al. 2007. Serotypes, clones, and mechanisms of resistance of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates collected in Spain. Antimicrob. Agents Chemother. 51: 3240-3246.
- 12) Klugman, K. P., J. R. Lonks. 2005. Hidden epidemic of macrolide-resistant pneumococci. Emerg. Infect. Dis. 11: 802-807.
- 13) Cerdá Zolezzi, P., L. M. Laplana, C. R. Calvo, et al. 2004. (P. G. Cepero, M. C. Erazo, R. Gómez-Lus, ed.), Molecular basis of resistance to macrolides and other antibiotics in commensal viridans group streptococci and *Gemella* spp. and transfer of resistance genes to *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 3462-3467.
- 14) Adam, H. J., K. N. Schurek, K. A. Nichol, et al. 2007. Molecular characterization of increasing fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates in Canada, 1997 to 2005. Antimicrob. Agents Chemother. 51: 198-207.

Evaluation of Antibacterial Activity of Newer Respiratory Quinolones against *Streptococcus pneumoniae*

Shigeru Fukuzawa,¹⁾ Kazuhiro Tateda,^{*1,2)} Yoshikazu Ishii,^{1,2)} Kyoko Enokizono,¹⁾ Ayumi Hikosaka,¹⁾ Rie Shibuya,²⁾ Chikako Maehara,¹⁾ Hinako Murakami,¹⁾ Kumiko Yasui,¹⁾ Shigeo Yumoto,¹⁾ Morihito Iwata,¹⁾ Keizo Yamaguchi^{1,2)}

¹⁾ Laboratory of Microbiology in Ohmori Hospital, Toho Medical Center

²⁾ Department of Microbiology and Infectious Diseases, Toho University School of Medicine

* Corresponding author

Antimicrobial susceptibility testing of newer quinolones, including developing agents, was performed against 356 strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated in our hospital. Approximately 60% of strains demonstrated less susceptible to penicillin-G. To clarithromycin, 264 strains (74.2%) were classified to be resistant, while 9 strains (2.5%) exhibited MIC of 2 µg/ml to telithromycin. MIC₉₀ (µg/ml) of quinolones were as follows: DX619 (0.031 or less), garenoxacin (0.063), sitafloxacin (0.063), tosfloxacin (0.25), moxifloxacin (0.25), gatifloxacin (0.5), levofloxacin (1), ciprofloxacin (2), pazufloxacin (2). Pulse-field gel electrophoresis analysis using levofloxacin or telithromycin less susceptible strains demonstrated no evidence of wide spreading of antibiotic resistant clone in our hospital. These data suggest efficacy of newer respiratory quinolones against *S. pneumoniae* infections, and further support need of continuous surveillance for appearance and spreading of antibiotic resistance organisms.