

[原 著]

成人の入院肺炎例より分離されたニューキノロン系薬耐性を含む
多剤耐性インフルエンザ菌の遺伝子解析野老洋夫¹⁾・岸井こずゑ³⁾・木村 望¹⁾・小浦彩子¹⁾
鈴木葉子²⁾・生方公子³⁾¹⁾ 東京女子医科大学東医療センター 検査科²⁾ 東京女子医科大学東医療センター 小児科³⁾ 北里大学北里生命科学研究所 & 大学院感染制御科学府 病原微生物分子疫学研究室

(平成 22 年 11 月 7 日受付, 平成 23 年 1 月 26 日受理)

肺炎と診断され、入院となった 71 歳 (症例 1) と 73 歳 (症例 2) の 2 名の喀痰培養から、 β -ラクタム系薬とニューキノロン系薬に明らかな耐性を示す *Haemophilus influenzae* を分離した。2 名が同一の看護チームでケアされていたことや、経験したことのない多剤耐性菌であったことから、院内伝播の可能性を疑った。この 2 株について薬剤感受性、薬剤耐性遺伝子解析、および Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) による菌株の相同性解析を行った。2 株とも ampicillin: >64 μ g/ml, sulbactam/ampicillin: 1/2 μ g/ml, amoxicillin: >64 μ g/ml, cefditoren: 8 μ g/ml, cefotaxime: 32 μ g/ml, ceftioxiacoxone: 8 μ g/ml, meropenem: 0.25 μ g/ml, ciprofloxacin: 16 μ g/ml, および levofloxacin: 8 μ g/ml と明らかな耐性を示した。2 株は TEM 型 β -ラクタマーゼ遺伝子を保持、さらに PBP3 をコードする *ftsI* 遺伝子の 2 カ所に変異が認められ、Ser385Thr と Arg517His のアミノ酸置換を有していた。この結果から、分離菌は β -lactamase-producing, amoxicillin clavulanic acid resistance (gBLPACR-II) と判定された。ニューキノロン系薬耐性では、DNA ジャイレースの *GyrA* のアミノ酸置換 (Ser84Phe と Asp88Asn)、トポイソメラーゼ IV の *ParC* のアミノ酸置換 (Glu88Lys)、*ParE* のアミノ酸置換 (Ala369Thr と Ser458Ala) が認められた。制限酵素 *SmaI* を用いた PFGE では、2 株が同一クローン株であることが示唆された。今までに経験したことのない多剤耐性菌であったために、2 例目の菌分離 (1 週間後) を確認した時点で院内伝播を疑い、インфекションコントロールチームの迅速な対応が可能であった。その後、同様の耐性菌は分離されずに終息した。今後、市中からの持ち込みと思われるこのような耐性菌にも配慮した院内感染対策が必要と結論された。

Key words: *Haemophilus influenzae*, キノロン系薬耐性, *gyrA*, *parC*, BLPACR-II, 院内感染

I. 序 文

Haemophilus influenzae (インフルエンザ菌) はさまざまな感染症の原因菌として知られるが、莢膜を有するインフルエンザ菌と持たない型別不能株 (nontypable インフルエンザ菌: NTHi) とに区別される。

莢膜株のうち、特に b 型のインフルエンザ菌は Hib 株として化膿性髄膜炎等の全身性感染症の原因菌として重要である。しかし、肺炎や急性中耳炎例から分離されるインフルエンザ菌のほとんどは、NTHi である¹⁾。

本菌の ampicillin (ABPC) 耐性は従来 β -ラクタマーゼによるものが知られ、 β -lactamase-producing, ABPC-resistant (BLPAR) インフルエンザ菌と呼ばれている。本邦における BLPAR の分離率は 1990 年代の後半頃まで 15~20%前後で推移してきた^{2),3)}。ところが、2000 年前後から BLPAR がしだいに減少するのと反比例して経口 β -ラクタム系薬に対する感受性の低

著者連絡先: (〒108-8641) 東京都港区白金 5-9-1
北里大学北里生命科学研究所 & 大学院感染制御科学府 病原微生物分子疫学研究室
生方公子
TEL: 03-5791-6385
FAX: 03-5791-6386
E-mail: ubukatak@lisci.kitasato-u.ac.jp

下したインフルエンザ菌が急速に増加してきた⁴⁾。この菌は β -ラクタマーゼ非産生であることから、 β -lactamase-nonproducing, ABPC-resistant (BLNAR) インフルエンザ菌と呼ばれる。この耐性機序は、 β -ラクタム系薬の作用標的である PBP3 に対する薬剤の親和性低下である。特に、化膿性髄膜炎由来のインフルエンザ菌において BLNAR が 44.9% を占めるに至り、治療上重要な問題を提起している⁵⁾。

最近さらに、BLPAR と BLNAR の耐性機序を併せ持つ菌、すなわち β -lactamase-producing, amoxicillin clavulanic acid-resistant (BLPACR) インフルエンザ菌が 10% 前後の割合で分離され始めている。本邦におけるこれらの BLNAR や BLPACR の分離率は欧米に比して著しく高い⁶⁾が、その理由として経口セフェム系薬が優位に使用されていること、Hib ワクチンが定期接種化されていないこと、保育園児等の保菌率の高いことが背景にあるといわれている⁷⁾。

一方、最近わが国でも、Hirakata ら⁸⁾によってニューキノロン系薬 (フルオロキノロン: FQ) 耐性インフルエンザ菌が報告されたが、この耐性菌は FQ 薬が成人に多く処方されている欧米において早い段階から注目されていた耐性菌である⁹⁾。

FQ 耐性の作用機序は、薬剤の作用標的である DNA ジャイレースをコードする *gyrA* 遺伝子、*gyrB* 遺伝子と、トポイソメラーゼ IV をコードする *parC* 遺伝子、*parE* 遺伝子のキノロン耐性決定領域 (quinolone resistance-determining region: QRDR) に生じた変異に起因する^{10), 11)}。

私たちは、同一病棟ではあるが、それぞれが異なる病室に入院中であった肺炎患者 2 名の喀痰培養より、1 週間の間に多剤耐性を示すインフルエンザ菌を分離した。FQ 薬に明らかな耐性であったことや、患者ケアを担当する看護チームが同一であったことの 2 点から院内伝播の可能性を疑った。インфекションコントロールチーム (ICT) は、2 例目の菌分離を確認した時点で迅速に対応し、それ以上の伝播は防止することができた。

当該菌株が院内において伝播したのか否かについて明らかにする目的で、i) PCR による耐性遺伝子解析、ii) FQ 耐性遺伝子解析、iii) PFGE 解析を行った。また、iv) 症例に対する抗菌薬使用状況、v) 保菌検査も実施した。本論文では主に分離された耐性菌の詳細と ICT 活動について報告する。

II. 材料と方法

1. 対象菌株

当院内科病棟に入院中の 71 歳 (症例 1: 男性) と 73 歳 (症例 2: 男性) の 2 名の肺炎患者から採取された喀痰より、1 週間の間隔で分離されたインフルエンザ菌 2 株、JPO396 と JPO397 を対象とした。

これらの対照株に、FQ 感性の Rd 株 (ATCC49766) と、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おいて、小児呼吸器感染症より分離した levofloxacin (LVFX) 感受性低下株 (ARD450 株, ARD857 株, ARD761 株, ARD253 株) を同時に解析した。

2. 菌種の同定

供試菌株の同定は、グラム染色性、オキシダーゼテスト、およびカタラーゼテスト実施後に、ID テスト HN ラピッド (日水製薬) とヘモフィルス ID4 分画培地 (ベクトン・ディッキンソン社 (BD)) による X 因子/V 因子要求性により確定した。なお、この裏づけとして、4 項で述べる *p6* 遺伝子の有無も検索した。

3. 薬剤感受性測定

薬剤感受性の測定にはドライプレート '栄研' (栄研化学(株)) を用いた。能書に従ってミュラーヒントンブイヨンにストレプト・ヘモサプリメント '栄研' を添加した培地を使用し、最終接種菌量は約 5×10^4 CFU/ウエルとなるように調整した。菌液はドライプレートの各ウエルに接種、 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ の好気環境下にて 20 時間培養後、増殖の有無を目視判定した。

感受性測定薬剤は、ABPC, sulbactam/ampicillin (SBT/ABPC), amoxicillin (AMPC), cefditoren (CDTR), cefotaxime (CTX), ceftriaxone (CTRX), meropenem (MEPM), ciprofloxacin (CPFX), LVFX の計 9 薬剤とした。

4. PCR による菌種同定、耐性遺伝子検索

PCR による菌種同定と耐性遺伝子検索は、既法¹²⁾ に準じ、「耐性インフルエンザ菌検索キット (湧永製薬(株))」を用いて実施した。

すなわち、解析した遺伝子は、i) インフルエンザ菌に特異的な P6 膜タンパクをコードする *p6*¹³⁾, ii) TEM 型 β -ラクタマーゼをコードする *bla*_{TEM-1} 遺伝子¹⁴⁾, iii) *ftsI* 遺伝子にコードされた PBP3 の Asn 526 の Lys へのアミノ酸置換 (*pbp3-1*)¹⁵⁾, iv) *ftsI* 遺伝子にコードされた PBP3 の Asn526Lys と Ser385 Thr の 2 カ所のアミノ酸置換 (*pbp3-2*)⁶⁾ を調べる計 4 遺伝子である。そのほかに、莢膜型 type b¹⁶⁾ の遺伝子と ROB 型 β -ラクタマーゼをコードする *bla*_{ROB-1} 遺伝子も検索した。¹⁷⁾

Table 1. Primers used for DNA amplifications of fluoroquinolone-resistant genes in *Haemophilus influenzae*

Gene and primer	Primer sequence	Amplicon size (bp)	Reference
<i>gyrA</i>			
Forward primer	5'-GGTTTAAAACCTGTTACCG-3'	420	In this study
Reverse primer	5'-TGCCATCCCCACCGCAATAC-3'		
<i>gyrB</i>			
Forward primer	5'-GGAAAATCCTGCAGATGC-3'	445	Davies, et al. ^{a)}
Reverse primer	5'-AAGCAACGTACGGATGTG-3'		
<i>parC</i>			
Forward primer	5'-ATCATGGATCGTGCGTTGCC-3'	708	In this study
Reverse primer	5'-AGATTGATGTGGAAGCGCTG-3'		
<i>parE</i>			
Forward primer	5'-GAACGCTTATCATCACGCCA-3'	471	Davies, et al. ^{a)}
Reverse primer	5'-AGCATCCGCGAGAATACAGA-3'		

^{a)} Davies, T. A., et al. 2000. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 633-639.²²⁾

Table 2. MICs of 9 antibiotics for clinical isolates of *Haemophilus influenzae* and reference strain

Antimicrobial agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$)*		
	JPO 396	JPO 397	ATCC 49766
Ampicillin	>64	>64	0.25
Sulbactam/Ampicillin	1/2	1/2	ND
Amoxicillin	>64	>64	0.25
Cefditoren	8	8	0.008
Cefotaxime	32	32	0.008
Ceftorixone	8	8	0.004
Meropenem	0.25	0.25	0.125
Ciprofloxacin	16	16	0.008
Levofloxacin	8	8	0.008

* MIC ($\mu\text{g/ml}$) interpretive standards for *H. influenzae* recommended by the CLSI as follows; Ampicillin ≤ 1 (S), 2(I), ≥ 4 (R); Cefotaxime and Ceftorixone ≤ 2 (S); Ciprofloxacin ≤ 1 (S); Levofloxacin ≤ 2 (S)

5. FQ 耐性化に関わる遺伝子の塩基配列解析

FQ 耐性化に関わる遺伝子の塩基配列解析は、Table 1 に示すプライマーを用い、*gyrA*、*gyrB*、*parC*、*parE* それぞれの QRDR 領域を増幅した。得られた PCR 産物は、QIA quick PCR purification kit[®] (Qiagen) にて精製後、BigDye Terminator Cycle Sequencing kit version 3.1 (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行った。DNA シークエンスには Applied Biosystems 3130/3130 \times 1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を使用した。

6. PFGE 解析

インフルエンザ菌の PFGE 解析は、既法¹⁸⁾に従い実施した。チョコレート寒天培地で 20 時間培養した被験菌は、2 ml の broth 中に 10^7 /ml になるように調整後、遠心・集菌し、1.2% 寒天と混合後 4 $^{\circ}$ C で固化しブロックを作製した。溶菌反応を行った後、続けてその

寒天ブロックを洗浄、次いで 30 U の *Sma*I 制限酵素にて 30 $^{\circ}$ C、16 時間の酵素反応を行い、DNA を切断した。電気泳動は CHEF MAPPER (Bio-Rad Laboratories) を使用し、14 $^{\circ}$ C、6 V/cm の条件で 20 時間 18 分の電気泳動を行った。

III. 結 果

1. 菌種と薬剤感受性

対象株の JPO396 株と JPO397 株の性状は、グラム陰性短桿菌、オキシダーゼ陽性、カタラーゼ陽性、ID テスト HN ラピッド同定コード“7105140”で相対確率 83%、X 因子と V 因子要求性、溶血陰性、PCR による *p6* の増幅 (+)、および PCR による莢膜 b 遺伝子の増幅 (-) であったことから、無莢膜型のインフルエンザ菌、すなわち NTHi と確定した。

2 株の薬剤感受性成績は、レファレンス株 Rd 株の

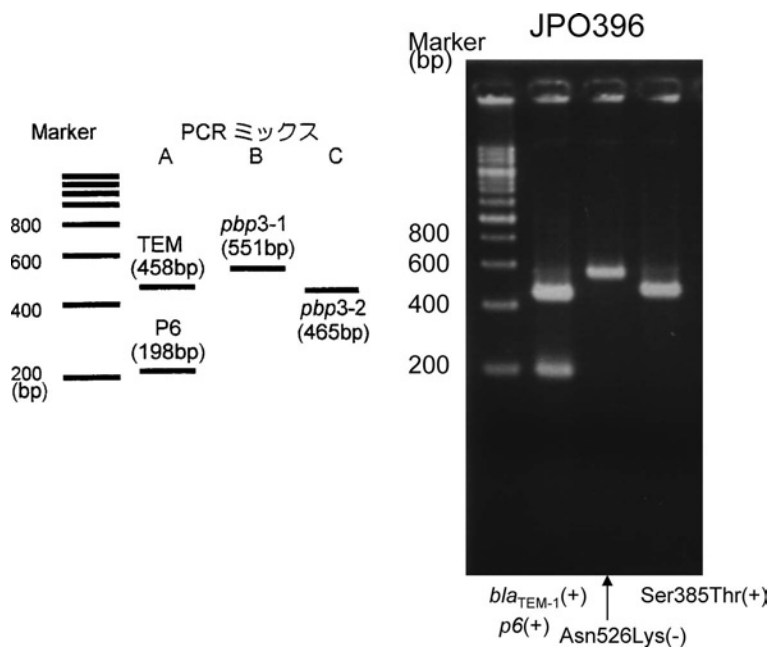


Fig. 1. Amplified DNA profiles of 4 genes in clinical isolate of *Haemophilus influenzae* (JPO396) by PCR

Table 3. Amino acid substitutions deduced from mutations in *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* genes of *Haemophilus influenzae* that decreased fluoroquinolone susceptibility

Strain	Amino acid substitutions:				MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	GyrA	GyrB	ParC	ParE	Levofloxacin	Ciprofloxacin
ATCC 49766 ^{a)}	—	—	—	—	0.008	0.008
ARD450 ^{b)}	Ser84Leu	—	—	—	0.125	0.06
ARD857 ^{c)}	Asp88Tyr	—	—	—	0.125	0.06
ARD761 ^{d)}	Asp88Tyr	—	—	—	0.25	0.06
ARD253 ^{e)}	Ser84Leu	Ala404Val	Asn138Ser	Ser458Pro	0.5	0.5
JPO396	Ser84Phe and Asp88Asn	—	Glu88Lys	Ala369Thr/Ser458Ala	8	16
JPO397	Ser84Phe and Asp88Asn	—	Glu88Lys	Ala369Thr/Ser458Ala	8	16

^{a)} Reference strain, ^{b)} ARD450: BLNAR, ^{c)} ARD857: BLNAS, ^{d)} ARD761: gBLPAR, ^{e)} ARD253: gBLNAS

成績とともに Table 2 に示す。両菌株とも MEPM には $0.25 \mu\text{g/ml}$ と感性であったが、ABPC や AMPC、経口抗菌薬の CDTR、注射薬の CTX や CTRX には感性のインフルエンザ菌が示す MIC に比べ、1,000 倍以上高い MIC を示す耐性株であった。

また、FQ の LVFX には $8 \mu\text{g/ml}$ 、CPFX には $16 \mu\text{g/ml}$ の MIC を示し、レファレンス株に比してやはり 500 倍以上高い MIC を示し、明らかな耐性株と判定された。

3. PCR による菌同定、耐性遺伝子検索

Fig. 1 には、菌種同定に用いた *p6* と耐性遺伝子の PCR 結果を示す。2 株とも結果は同一であったため、

JPO396 株の成績のみ示した。*p6* が (+)、*bla*_{TEM-1}(+)、PBP3 をコードする *ftsI* 上の Asn526Lys へのアミノ酸置換に対応する感性菌側の DNA を増幅する *pbp3-1* による増幅 (+)、すなわち、Asn526Lys 置換は認められなかった。しかし、BLNAR で増幅される *pbp3-2* が (+) であったため、耐性化に最も重要な Ser385Thr 置換のあることを認めた。

この DNA 増幅パターンから、2 株は TEM 型 β -ラクタマーゼ産生性、かつ *ftsI* 変異に起因する PBP のアミノ酸置換を有する genotype(g) では gBLPACR-II と判定された。*ftsI* は後日改めて塩基配列解析を行い、Ser385Thr に加えて耐性化に影響することがす

で明らかにになっている⁶⁾ Arg517His 置換も有していることを確認した。

なお、ROB 型 β -ラクタマーゼをコードする *bla*_{ROB-1} の増幅はみられなかった。

4. FQ 耐性遺伝子の塩基配列解析

JPO 396 株と JPO 397 株の *gyrA* と *gyrB*, *parC* と *parE* について塩基配列解析し、その結果から推定されるアミノ酸置換の成績を、LVFX および CPFYX の MIC とともに Table 3 に示す。これらの対照として、FQ 感性の Rd 株 (ATCC49766), および LVFX の感受性がやや低下している小児由来 4 株の成績も併せて示した。

対象の 2 株では、*gyrA* の QRDR 上に 2 個の変異が認められ、それらは DNA ジャイレースの GyrA の Ser84Phe と Asp88Asn の二つのアミノ酸置換に相当した。また、*parC* には 1 個の塩基変異が認められ、トポイソメラーゼ IV の ParC の Glu88Lys のアミノ酸置換に相当した。そのほかに ParE の Ala369Thr

と Ser458Ala の置換が認められた。

レファレンス株の ATCC49766 株ではそれぞれの遺伝子上には変異は認められなかった。対照とした小児由来株は、LVFX の MIC が 0.125 μ g/ml と感性菌に比して 10 倍以上低下していたが、これらの株のうち 3 株は GyrA に 1 個のアミノ酸置換、1 株は GyrA と ParC に各 1 個のアミノ酸置換が認められた。

5. PFGE 解析

Fig. 2 には JPO396 株と JPO397 株の PFGE 解析の結果を示す。

制限酵素として *Sma*I を用いたが、2 株の DNA 切断パターンは同一プロファイルを示し、同一クローン株であることが示唆された。

6. 症例の入院後における抗菌薬使用状況

1) 症例 1 (71 歳): 抗菌薬使用状況は、入院 21 日間でそれぞれ、第一世代セフェム系薬、カルバペネム系薬が使用され、FQ 系薬である ciprofloxacin はインフルエンザ菌検出後 (検体提出日) から 9 日間使用された。臨床経過は、中咽頭癌、脱水、代謝性アシドーシス、倦怠感、体力消耗で入院後、CT 検査にて左肺上葉肺炎と診断されている。21 日間療養後、中咽頭癌にて永眠された。入院時には喀痰より *Pseudomonas aeruginosa* が 3(+) 検出されていたが、入院 10 日後に提出された喀痰からは今回の耐性インフルエンザ菌が 3(+), *P. aeruginosa* が 3(+), *Enterobacter aerogenes* が 2(+) が検出された。肺炎の原因がこれらいずれの菌であったのかは明らかにできていない。

2) 症例 2 (73 歳): 抗菌薬使用状況は、入院 97 日間でそれぞれ、注射用セフェム系薬、バンコマイシン等が使用され、FQ 系薬である LVFX はインフルエンザ菌検出の 3 カ月前に 5 日間のみ使用されていた。既往には高血圧症で他院に通院していた以外特記すべきことはなかった。入院の 1 カ月前より食事摂取時にむせることが多かった。臨床経過は、咳嗽、歩行困難で入院後、胸部 X 線検査で肺炎と診断、3 カ月の療養後、感染性心内膜炎を併発し永眠された。本症例において耐性インフルエンザ菌が喀痰から分離されたのは、死亡直前であったが、菌量は 3(+) であった。本例におけるインフルエンザ菌の検出は、症例 1 の 1 週間後であった。

7. インфекションコントロールチーム (ICT) の対応

細菌検査室にて多剤耐性インフルエンザ菌の院内感染が疑われたため、直ちに ICT に報告、対応を協議した結果、当該病棟におけるスタンダードプリコーション実施の徹底・強化とともに、特に口腔ケアや喀痰吸

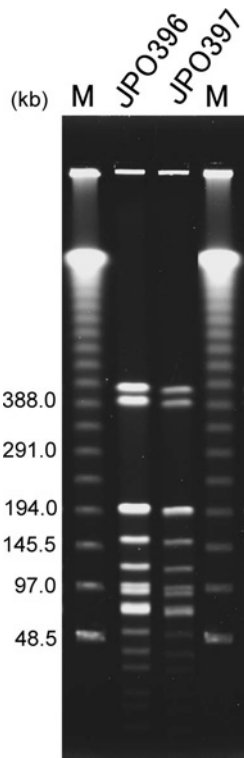


Fig. 2. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns of multidrug-resistant *Haemophilus influenzae* isolates (JPO396 and JPO397)

M: lambda ladder marker.

引時の手技を見直した。同時に菌検出患者担当看護ケアチームが担当している患者 18 名の保菌調査（検体は口腔ぬぐい液、扁桃ぬぐい液、喀痰、気管吸引物）を実施した。その結果、多剤耐性インフルエンザ菌の検出はなく、その後の院内感染は防止された。

IV. 考 察

2010 年、私たちはインフルエンザ菌感染症の第一選択薬である FQ 薬に明らかな耐性を示す gBLPA-CR-II の多剤耐性インフルエンザ菌の院内感染と思われる事例を経験した。症例 1 は入院 10 日後に当該菌が分離され、症例 2 は異なる病室に入院しており、1 例目の菌分離 1 週間後に分離されていた。患者同士の接点はなかった。

わが国におけるインフルエンザ菌のβ-ラクタム系薬耐性菌、すなわち gBLNAR は、小児科領域では Hib での著しい増加もあって治療上の問題となって久しい。また、最近ではβ-ラクタマーゼを産生し、PBP3 も変化したいわゆる gBLPACR-II も増加傾向にあるとされる。

他方、欧米ではそれらの耐性菌よりも成人に多く使用される FQ 薬に対する耐性化が目され、その耐性機序についてもすでにいくつか報告されている¹⁹⁾。わが国においては、Hitakata ら⁸⁾が FQ 薬に対する感受性の低下した臨床分離株について遺伝子解析を行い、CPFVX に 16 μg/ml の MIC を示す株では *gyrA* の QRDR 領域に 2 カ所の遺伝子変異による GyrA 酵素の Ser84Leu と Asp88 Gly のアミノ酸置換、*parC* で 1 カ所の変異による ParC 酵素の Glu88Lys のアミノ酸置換を認めている。そのほかに *gyrB* と *parE* にも変異がみられたと報告している。また、CPFVX の MIC が 0.5 μg/ml 前後の株では、*gyrA* と *parC* にそれぞれ 1 カ所の変異等が認められたと報告されている。

私たちが解析した FQ 薬耐性株では、GyrA の Ser 84 が Leu ではなく Phe へ置換していたことが異なっていた。また、アミノ酸置換を有する遺伝子とアミノ酸置換数の違いによる MIC の上昇をみるため、FQ 薬に対する MIC が感性菌に比べ 10～20 倍とやや上昇した小児由来の 4 株を比較のために解析したが、それらの株では主に *gyrA* に 1 カ所の変異を認めたのみである。基礎研究では、このような FQ 薬耐性は、FQ 薬と菌との接触によって遺伝子変異が生じ獲得されることは、試験管内実験でもすでに証明されていることである²⁰⁾。

今回の 2 症例においては、FQ 薬の投与は症例 2 において菌が分離された 3 カ月前に LVFX (500 mg×

1 回/日、5 日間) が投与されていたことが明らかになっている。しかし、菌の分離時期は症例 1 が症例 2 よりも 1 週間前に分離されているので、FQ 薬の投与が直接耐性化の引き金になったとは考えにくい。むしろ、症例 1 が入院前にすでに本菌をわずかながら保菌していたと考えるのが妥当であろう。

遺伝子学的にみて同一のインフルエンザ菌が検出された 2 名は、ADL (Activities of Daily Living) が悪く、入院後同室になった記録もなく、したがって飛沫感染 (ヒト-ヒト感染) による感染は考えにくい。両名のケアが同一看護チームによって行われていたこと等を考慮すると、看護師あるいは医師などの医療従事者を介した接触感染である可能性が否定できない。通常、同一病棟でインフルエンザ菌が 2 例程度分離されても院内感染を疑うことはないが、まれな耐性菌であったためにそれを疑った。

日常業務においては、院内感染の原因菌として methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* や緑膿菌などを対象とすることが多いが、入院例の高齢化に伴い、今後は市中型感染症の原因菌であるインフルエンザ菌や肺炎球菌等による感染事例も念頭においた ICT 活動が必要であることを痛感した。

日本呼吸器学会による成人市中肺炎診療ガイドライン²¹⁾では、慢性下気道感染症の empiric therapy にレスピラトリーキノロンが第一選択薬の一つとして推奨されている。本系統の薬剤が気道感染症の主要な起炎菌を広くカバーすることは周知の事実であるが、世界的にそれらの菌種における FQ 薬耐性菌が報告されている。

特に慢性疾患を有する成人例の入院時には抗菌薬投与履歴の確認が必要であり、抗菌薬投与前の起炎菌の検索と感受性検査の実施も必要であると結論される。

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—肺炎球菌等による市中感染症研究会収集株のまとめ—. 日治療誌 50: 794-804.
- 2) 生方公子, 高橋洋子, 紺野昌俊. 1978. 本邦で分離された ampicillin 耐性 *Haemophilus influenzae* の性状について. Chemotherapy 26: 491-498.
- 3) 柳瀬義男, 生方公子, 高橋洋子, 他. 1978. *Haemophilus influenzae* 感染症治療におけるペニシリン系抗生物質の意義について. 第二編 最近臨床から分離された *Haemophilus influenzae* に対する各種抗生物質の意義についての基礎的検討.

- Chemotherapy 26: 508-516.
- 4) 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. 感染症誌 78: 835-845.
 - 5) 生方公子. 2008. 第 19 回日本臨床微生物学会総会 アナライザー・ワークショップ, 51.
 - 6) Ubukata, K., Y. Shibasaki, K. Yamamoto, et al. 2001. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with β -lactam resistance in β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 1693-1699.
 - 7) Hasegawa, K., R. Kobayashi, E. Takada, et al. 2006. High prevalence of type b β -lactamase-non-producing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in meningitis: The situation in Japan where Hib vaccine has been introduced. J. Antimicrob. Chemother. 57: 1077-1082.
 - 8) 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 Chemother. 53: 4225-4230.
 - 9) Pérez-Vázquez, M., F. Román, B. Aracil, et al. 2003. *In vitro* activities of garenoxacin (BMS-284756) against *Haemophilus influenzae* isolates with different fluoroquinolone susceptibilities. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 3539-3541.
 - 10) Georgiou, M., R. Muñoz, F. Román, et al. 1996. Ciprofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae* strains possess mutations in analogous positions of GyrA and ParC. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 1741-1744.
 - 11) Vila, J., J. Ruiz, F. Sanchez, et al. 1999. Increase in quinolone resistance in a *Haemophilus influenzae* strain isolated from a patient with recurrent respiratory infections treated with ofloxacin. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 161-162.
 - 12) Hasegawa, K., K. Yamamoto, N. Chiba, et al. 2003. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. Microb. Drug Resist. 9: 39-46
 - 13) Nelson, M. B., M. A. Apicella, T. F. Murphy, et al. 1988. Cloning and sequencing of *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P6. Infect. Immun. 56: 128-134.
 - 14) Sutcliffe, J. G. 1978. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 3737-3741.
 - 15) Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, et al. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science 269: 496-512.
 - 16) Van Eldere, J., L. Brophy, B. Loynds, et al. 1995. Region II of the *Haemophilus influenzae* type b capsulation locus is involved in serotype-specific polysaccharide synthesis. Mol. Microbiol. 15: 107-118.
 - 17) Juteau, J. M., R. C. Levesque. 1990. Sequence analysis and evolutionary perspectives of ROB-1 beta-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 1354-1359.
 - 18) Yano, H., M. Suetake, A. Kuga, et al. 2000. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of asopharyngeal flora in children attending a day care center. J. Clin. Microbiol. 38: 625-629.
 - 19) Pérez-Vázquez, M., F. Román, B. Aracil, et al. 2004. Laboratory detection of *Haemophilus influenzae* with decreased susceptibility to nalidixic acid, ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin due to GyrA and ParC mutations. J. Clin. Microbiol. 42: 1185-1191.
 - 20) 田中真由美, 高瀬浩之. 2005. キノロン薬耐性. 化学療法の領域 21(9): 75-82.
 - 21) 日本呼吸器学会成人市中肺炎診療のためのガイドライン作成委員会. 2007. 成人市中肺炎診療ガイドライン. 日本呼吸器学会.
 - 22) Davies, T. A., L. M. Kelly, D. B. Hoellman, et al. 2000. Activities and postantibiotic effects of gemifloxacin compared to those of 11 other agents against *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 633-639.

Molecular Analysis for Resistance to Multidrug Including Fluoroquinolones in
Haemophilus Influenzae Isolated from Elderly Patients with Pneumonia

Hiroo Tokoro,¹⁾ Kozue Kishii,³⁾ Nozomi Kimura,¹⁾ Ayako Oura¹⁾
Yoko Suzuki,²⁾ Kimiko Ubukata³⁾

¹⁾ Clinical Laboratory, Tokyo Women's Medical University Medical Center East

²⁾ Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical University Medical Center East

³⁾ Laboratory of Molecular Epidemiology for Infectious Agents, Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University

Two strains of *Haemophilus influenzae* that show resistances to third generation β -lactam antibiotics and fluoroquinolone (FQ) agents were isolated from two elderly inpatients with pneumonia within a short term of hospitalization. We considered the possibility of hospital transmission of these multidrug resistant strains for a reason that both patients received medical cares from the same nursing staffs. To clarify the matter, the following four analysis were performed to the agents; re-testing of antibiotic susceptibility, identification of genotypic β -lactam resistance, sequence analysis for FQ resistance, and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Both strains were highly resistant to ampicillin ($>64 \mu\text{g/ml}$), sulbactam/ampicillin ($1/2 \mu\text{g/ml}$), amoxicillin ($>64 \mu\text{g/ml}$), cefditoren ($8 \mu\text{g/ml}$), cefotaxime ($32 \mu\text{g/ml}$), ceftoraxone ($8 \mu\text{g/ml}$), ciprofloxacin ($16 \mu\text{g/ml}$), and levofloxacin ($8 \mu\text{g/ml}$), respectively. They were also characterized genotypically as β -lactamase-producing amoxicillin clavulanic acid resistance (BLPACR-II) resulting from the presence of TEM-1 β -lactamase gene and amino acid substitutions of Ser385Thr and Arg517His in *ftsI* gene encoding penicillin-binding protein 3 in the strains. In FQ resistance, amino acid substitutions of Ser84Phe and Asp88Asn in GyrA encoded by a *gyrA* gene, Glu88Lys in ParC encoded by a *parC*, and Ala369Thr and Ser458Ala in ParE encoded by a *parE*, were identified in these strains. PFGE profiles practiced for these agents showed that they were clonally identical. Prompt interventions by the staffs of infection control team could prevent the spread of multidrug-resistant *H. influenzae*. It is also important to practice infection control with consideration for invasion of resistant organisms from community into hospital.