

県内で分離されたペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)臨床株の血清型および薬剤耐性遺伝子の解析

園部祥代 仙波敬子 木村俊也 大倉敏裕* 四宮博人

Studies of serotypes and antimicrobial resistance genes of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*(PRSP) strains isolated from patients in Ehime

Sachiyo SONOBE, Keiko SEMBA, Toshiya KIMURA,
Toshihiro OHKURA, Hiroto SHINOMIYA

Streptococcus pneumoniae can cause community-acquired pneumonia and invasive pneumococcal diseases (IPD). In Japan, the pneumococcal 13-valent conjugate vaccine (PCV13) is recommended for routine use in infants and has been used since 2013. However, the serotype specificity of the vaccine has led to concern that its use may increase carriage of and disease from serotypes not included in the vaccine (serotype replacement). In addition, penicillin-resistant and other drug resistant *Streptococcus pneumoniae* have increased. In this study, we thus examined serotypes and drug-resistance of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from patients in Ehime. Results suggested the degree of serotype replacement and drug resistance of these strains seem to be significant, and further study will be necessary to investigate these points.

Keywords : penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*, antimicrobial resistance gene, serotype replacement, multiplex PCR

はじめに

肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) は、市中肺炎の主要な原因菌であり、五類全数把握疾患である侵襲性肺炎球菌感染症 (invasive pneumococcal diseases: IPD) の原因菌でもある。

わが国では、7価肺炎球菌結合型ワクチン (pneumococcal conjugate vaccine: PCV7)、13価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13) および23価肺炎球菌ワクチン (pneumococcal polysaccharide vaccine: PPSV23) が承認されている。PCV7は2010年2月から乳幼児に任意接種として導入され、2013年4月から定期接種化された。さらに、PCV13が2013年11月よりPCV7に代わり定期接種化され、

接種率は90%以上と非常に高い¹⁾。それにより、小児のIPDの減少が報告²⁻⁴⁾されているが、ワクチン非含有の血清型の増加 (血清型置換) が問題となっている²⁻⁴⁾。

加えて、従来第一選択薬であったペニシリンに対する耐性菌 (ペニシリン耐性肺炎球菌, PRSP) の増加、多剤耐性化も世界的な問題となっており^{5,6)}、わが国では、1985年頃から肺炎球菌に占めるPRSPの割合が増加し、2009年には63%に達し、88%の肺炎球菌がマクロライド系抗菌薬に対しても耐性であると報告されている⁷⁾。

そこで、今回、愛媛県で分離されたペニシリン耐性肺炎球菌株の血清型と薬剤耐性についてPCR法による検討を行ったので報告する。

平成26年4月から平成28年4月に県内の医療機関より PRSPとして収集(五類定点把握感染症の基準に準じて収集)し、PCR法により莢膜多糖体遺伝子(*cpsA*)および自己融解酵素遺伝子(*lytA*)の保有を確認した株(43株)を検体として使用した。

2 血清型別

羊血液寒天培地にて一晚培養した肺炎球菌を滅菌蒸留水200 μ lに懸濁し、100°C10分間加熱後、12000rpm、5分間遠心分離した上清をDNAテンプレートとした。

PCR反応は既報⁸⁾に従い、8つのMultiplex PCR反応を実施した。プライマー配列はCDCホームページ(<http://www.cdc.gov/streplab/pcr.html>)を参照した。

3 薬剤耐性遺伝子検出

血清型別と同一のテンプレートにより、ペニシリン耐性肺炎球菌遺伝子検出用試薬(湧永製薬)を用い、ペニシリン耐性に関わる遺伝子(*pbp1a*, *pbp2b*, *pbp2x*)およびマクロライド耐性遺伝子(*mefA*, *ermB*)の検出を行った。

結果

1 血清型別

Multiplex PCR法による血清型別の結果、血清型は10種類に分類された。最も多く検出された血清型は15A/15Fであり、全体の28%を占め、19Aが18%、6A/6B/6C/6Dが12%検出された。また、型別不能(UT)が12%認められた。(図1)

年齢別で集計すると、0~3歳(総株数17)での15A/15F(7株)の割合が最も多く、41%であった。また、0~3歳で

は19Aは検出されず、4~19歳や20~64歳では19Aの割合が最も多く、それぞれ43%と40%であった。(図2)

2 薬剤耐性遺伝子検出

pbp1a, *pbp2b*, *pbp2x*の検出の結果、全ての株で2つ以上の*pbp*遺伝子の変異し、3つの*pbp*遺伝子の変異しているものも33株(77%)認められた(図3)。マクロライド耐性遺伝子についても全ての株で検出され、*mefA*と*ermB*の両遺伝子を保有しているものは26%であった。(図4)

考察

肺炎球菌の血清型は莢膜の抗原性により分類され、現在90種類以上に分類されている。臨床例で検出される血清型には偏りがあり、多く検出される血清型を対象とした

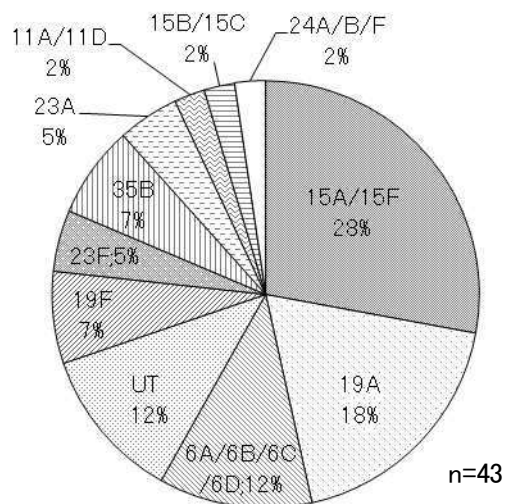


図1 肺炎球菌株の血清型別結果(全年齢)

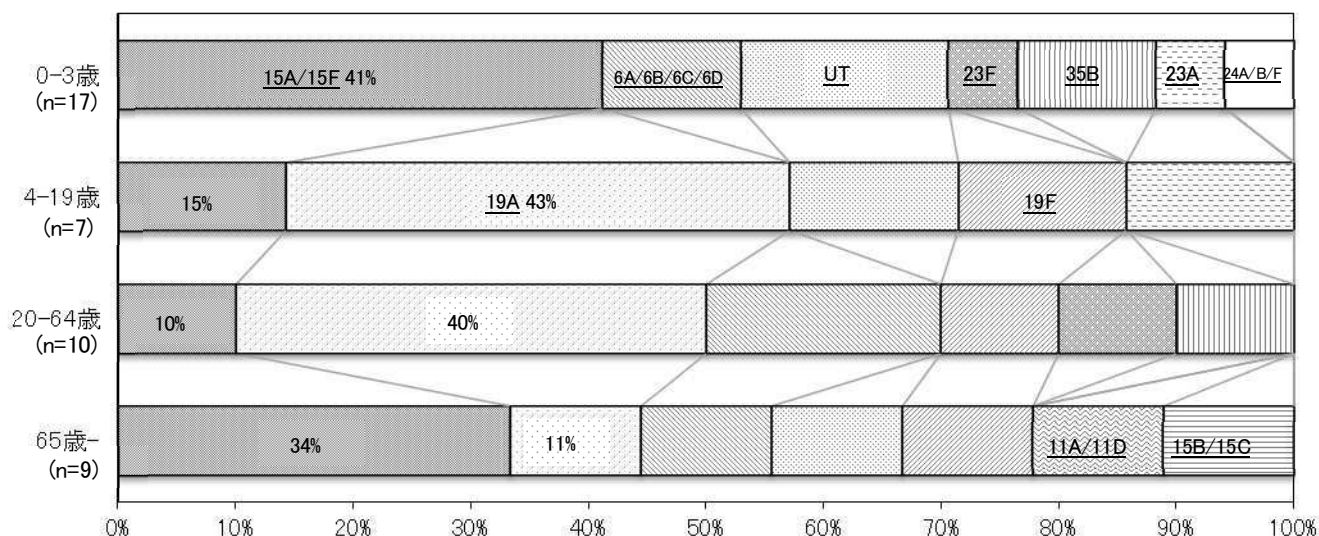


図2 肺炎球菌株の血清型別結果(年齢別)

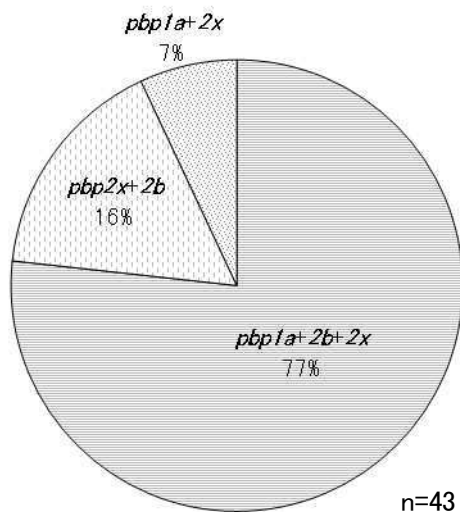


図3 *pbp*の変異状況

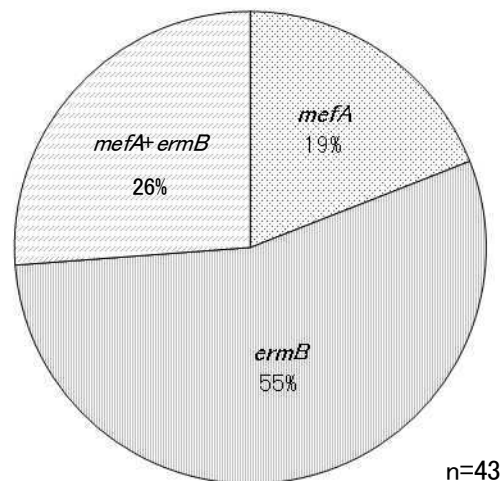


図4 マクロライド耐性遺伝子保有状況

ワクチンが開発実用化されている。これにより、小児のIPDの減少が報告^{2,4)}されている。また、PCV7に含まれる血清型にペニシリン耐性株が多いことも報告^{9,10)}されており、薬剤耐性対策としてもワクチンの重要性が認識されている。

しかしながら、ワクチン定期接種化後には、ワクチンタイプの血清型による小児IPDの減少の一方で、非ワクチンタイプの株の増加および増加した非ワクチンタイプの株にペニシリン耐性株が出現してきているとの報告²⁾がある。よって、ワクチン接種による肺炎球菌感染症原因血清型の推移およびその薬剤耐性を把握することは大変重要であると考えられる。

また、血清型置換についての報告は、現在のところIPDに関するものがほとんどであるが、肺炎球菌はIPD以外にも肺炎、中耳炎、副鼻腔炎などの呼吸器・耳鼻科領域非侵襲性感染症の原因菌でもあり、それらを含めた血清型のモニターも有用であると考えられることから、今回は、侵襲性非侵襲性を問わず、県内の医療機関で検出されたペニシリン耐性肺炎球菌株についての解析を行った。

肺炎球菌の血清型決定には抗莢膜血清を用いた莢膜膨化法による型別が標準的な方法である。しかしながら、すべての血清型に対する血清を揃えると高額になり、手技にも熟練を要すことから、実施できる施設は限定される。一方、今回実施したmultiplex PCR法による血清型別は、簡便で比較的低コストであることから、近年その有用性が報告^{8,11)}されている。当所でも肺炎球菌の血清型別はこれまで実施していなかったが、multiplex PCR法を用いることで型別が可能となった。

今回の型別の結果、最も多く検出された血清型は15A/15F

であり、これは現在実用化されているどのワクチンにも含まれない型であり、ペニシリン耐性率が高いとの報告²⁾がある血清型である。15A/15Fは特に0～3歳の年齢層で41%と多く検出され、4～19歳、20～64歳の年齢層ではそれぞれ15%、10%と検出率は少なくなっている。次に多く検出されたのはPCV13に含まれる19Aで、0～3歳の年齢層では検出されず、4～19歳、20～64歳の年齢層ではそれぞれ43%、40%と検出率は高くなっている。乳幼児のワクチンは2013年に定期接種化され、接種率も高いため、0～3歳の年齢層ではワクチン接種が行われている可能性が高いので、これらはワクチンによる血清型置換の結果であると考えられた。

さらに、薬剤耐性遺伝子の検出の結果、すべての株で*pbp*の変異およびマクロライド耐性遺伝子の保有が認められ、薬剤感受性試験結果からPRSPとして収集された株であるが、すべての株で*pbp*の変異も認められた。また、マクロライド耐性についてもすべての株で認められ、ペニシリン耐性と同時にマクロライド耐性がかなり高率に認められた。

本研究は愛媛県立衛生環境研究所特別研究調査事業の一部としてなされたものである。

まとめ

- 1 平成26年4月から平成28年4月に県内の医療機関よりPRSPとして収集した肺炎球菌について、PCR法により血清型別および薬剤耐性遺伝子を検出した。
- 2 血清型は10種類に分類された。非ワクチンタイプの血清型が0～3歳の年齢層で多く検出され、血清型置換が示

唆された。

3 薬剤耐性遺伝子の検出により、薬剤感受性試験結果によりPRSPとされた株は*pbp*の変異も認められることが確認できた。また、ペニシリン耐性と同時にマクロライド耐性の株が高率に認められた。

4 肺炎球菌の血清型および薬剤耐性の状況について、愛媛県内の状況はこれまで不明であったが、血清型置換および薬剤耐性化が進んでいることが示唆され、今後も注視が必要であると考えられた。

文 献

1) 定期の予防接種実施者数:厚生労働省

<http://www.mhlw.go.jp/topics/bcg/other/5.html>

2) 庵原俊昭ほか:厚生労働科学研究補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「新しく開発されたHib, 肺炎球菌, ロタウイルス, HPV等の各ワクチンの有効性, 安全性並びにその投与方法に関する基礎的・

臨床的研究」,(2013)

3) Chiba N. et al: *Micobiol Drug Resist*,19(4):308-315,2013

4) 国立感染症研究所:病原微生物検出情報,34,62-66(2013)

5) Appelbaum PC.: *Clin Infect Dis* 15,77-83(1992)

6) Linares J et al: *Clin Infect Dis* 15,99-105(1992)

7) 国立感染症研究所:病原微生物検出情報,34,55-56(2013)

8) 永井祐樹ほか:三重県保健環境研究所年報、16(59)42-48(2014)

9) 国立感染症研究所:病原微生物検出情報,34,57-58(2013)

10) Morozumi M. et al: *Epidemiol Infect*,142(4):812-819 (2014)

11) 国立感染症研究所:病原微生物検出情報,34,67-68(2013)