

## 【短報】

下気道由来検体から分離された  $\beta$ -lactamase non-producing ampicillin resistant*Haemophilus influenzae* (BLNAR) の分離頻度と薬剤感受性

中村 茂樹<sup>1)</sup>・柳原 克紀<sup>1,2)</sup>・森永 芳智<sup>1,2)</sup>・木谷 貴嘉<sup>2)</sup>・松田 淳一<sup>2)</sup>・泉川 公一<sup>1)</sup>  
関 雅文<sup>1)</sup>・掛屋 弘<sup>1)</sup>・山本 善裕<sup>1)</sup>・田代 隆良<sup>1,3)</sup>・上平 憲<sup>2)</sup>・河野 茂<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 長崎大学医学部・歯学部附属病院第二内科\*

<sup>2)</sup> 同 検査部

<sup>3)</sup> 長崎大学医学部保健学科

(平成 20 年 7 月 14 日受付・平成 20 年 10 月 21 日受理)

2000 年から 2006 年までに当院で喀痰など下気道呼吸器検体より分離された  $\beta$ -lactamase non-producing ampicillin (AMP)-resistant *Haemophilus influenzae* (BLNAR) の retrospective な検討を行った。また保存された下気道呼吸器検体由来 BLNAR 43 株を対象に薬剤感受性試験を行い、有効抗菌薬の検討を行った。 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬耐性の判定は CLSI (Clinical Laboratory and Standards Institute) の AMP 耐性基準を参考に感受性菌 (AMP MIC  $\leq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )、中間耐性菌 (AMP MIC =  $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ )、耐性菌 (AMP MIC  $\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) に分類した<sup>1)</sup>。 $\beta$ -ラクタマーゼ産生株は減少傾向を示していたが、BLNAR は徐々に増加傾向を示し、2006 年度には中間耐性株と耐性株を合わせると 50% 超に達していた。薬剤感受性試験ではペニシリン系抗菌薬、セフェム系抗菌薬では piperacillin (PIPC)、ceftazidime (CAZ)、ceftriaxone (CTRX) は良好な感受性を有していたが、cefotiam (CTM)、cefotaxime (CTM)、cefepime (CFPM) の感受性は低下していた。またカルバペネム系抗菌薬では meropenem (MEPM) と doripenem (DRPM) は良好な感受性を有していたが imipenem (IPM)、biapenem (BIPM) の感受性は低下していた。マクロライド系抗菌薬では azithromycin (AZM) が最も優れていた。フルオロキノロン系抗菌薬 (levofloxacin ; LVFX, gatifloxacin ; GFLX, moxifloxacin ; MFLX) はすべて良好な感受性を有していたが、1 株のみ LVFX 感受性が  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  と低下した株を認めた。小児科領域だけでなく呼吸器内科領域でも BLNAR は急速に増加しており、今後、市中肺炎や慢性気道感染症などの治療に難渋する症例が増えることが懸念される。また同系統抗菌薬間でも BLNAR に対する抗菌活性に差を認めることから、*H. influenzae* 感染症治療の際には抗菌薬選択に注意が必要である。

**Key words:** adult community acquired pneumonia, *Haemophilus influenzae*,  $\beta$ -lactamase non-producing ampicillin resistant *Haemophilus influenzae*, drug resistance

*Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) は、肺炎球菌と並び、成人市中肺炎の主要な原因菌の一つである。また、小児科領域においては難治性中耳炎、細菌性髄膜炎などの原因菌としても重要である。近年、*H. influenzae* は抗菌薬の耐性化が進み、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬をはじめとする多くの抗菌薬に対し耐性を示すようになった<sup>2,3)</sup>。*H. influenzae* の  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬耐性機序は  $\beta$ -ラクタマーゼの産生、または penicillin-binding protein (PBP) の変異による  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の親和性低下であるとされる<sup>4)</sup>。わが国では、これまで  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬耐性 *H. influenzae* は  $\beta$ -ラクタマーゼ産生株によるものが主体であったが、近年、 $\beta$ -lactamase non-producing ampicillin-resistant *H. influenzae* (BLNAR) が急速に拡が

り、抗菌薬選択のうえで難渋する症例が増加してきている。また最近では免疫抑制剤ならびにステロイド投与症例など易感染性患者での感染例や、高齢者人口の増加に伴い高齢者での重症例などが報告されている<sup>5)</sup>。*H. influenzae* は重要な病原微生物であり、その抗菌薬耐性状況の解析は、適切な抗菌薬の選択、および今後の薬剤耐性菌増加の抑制に役立つものと考えられる。今回、われわれは当院における BLNAR の分離状況、および薬剤感受性試験の解析を行い BLNAR に対する有効抗菌薬の検討を行ったので文献的考察を加えて報告する。

検討対象は 2000 年から 2006 年まで長崎大学医学部・歯学部附属病院で分離された下気道由来呼吸器検体 384 検体の統計結果を基に retrospective に解析した。 $\beta$ -ラ

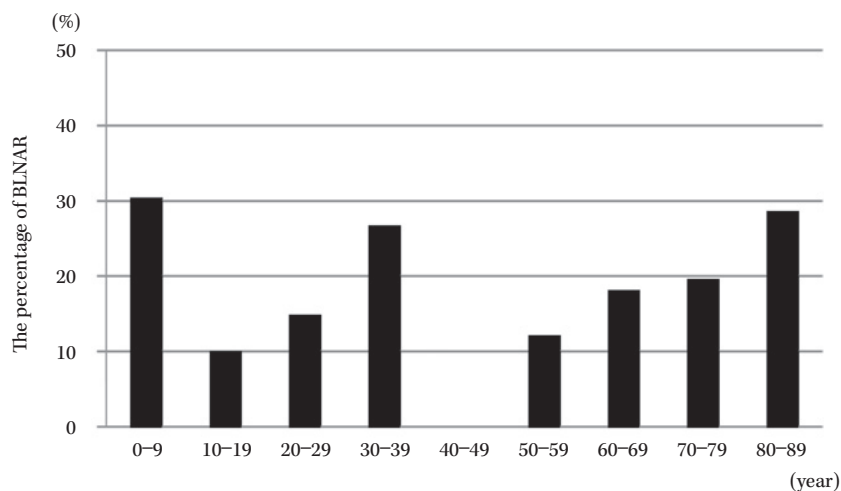


Fig. 1A. The age-specific-ratio of BLNAR isolates from lower respiratory tract. There are three peaks in 0-9 years, 30-39 years, and 80-89 years.

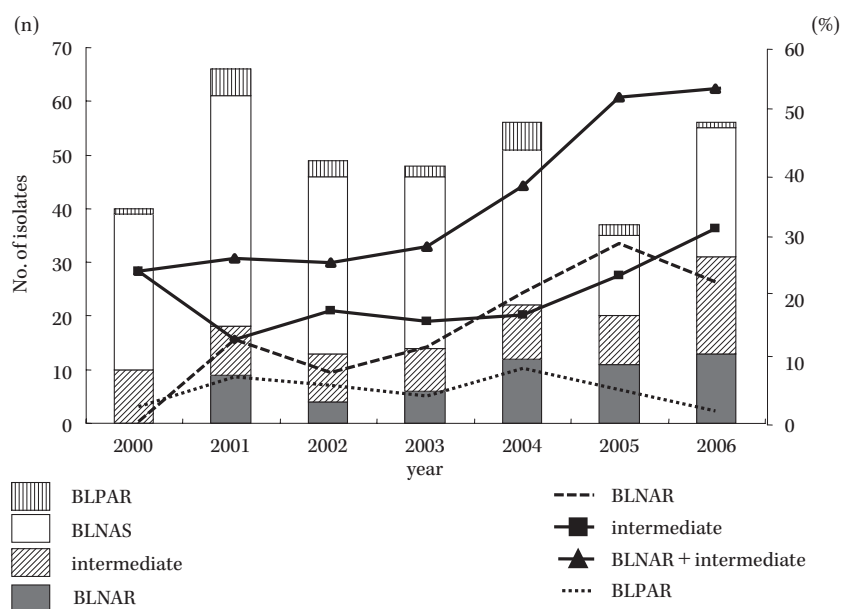


Fig. 1B. The prevalence of BLNAR in Nagasaki University Hospital from 2000 to 2006.

クタム系抗菌薬耐性の判定は CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) の判定基準に基づき, ampicillin (AMP) の最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration ; MIC) が  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  以下を感受性株,  $2 \mu\text{g}/\text{mL}$  を中間耐性株,  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上を耐性と定めた。薬剤感受性試験は 2000 年~2006 年の間に 10% グリセロール添加 Trypticase soy broth 中に  $-80^\circ\text{C}$  で冷凍保存されていた BLNAR 43 株を対象に行った。検体はすべて呼吸器 (下気道) 由来であり, 喀痰, 気管支鏡下採痰, 気管支肺胞洗浄液が含まれる。MIC 測定は, CLSI に準じ, HTM broth (Mueller Hinton broth に hematin  $15 \text{ mg}/\text{L}$ , NAD  $15 \text{ mg}/\text{L}$  を加えたもの) を基礎培地とし, 微量液体希釈法で測定した。 $37^\circ\text{C}$  で約 20 時間培養後, 肉

眼的に菌の発育が認められない最小抗菌薬濃度を MIC とした。

*H. influenzae* が分離された患者背景を示す。男性 233 例, 女性 151 例であった。年齢別 BLNAR 分離率を Fig. 1A に示す, 0~9 歳, 30~39 歳, 80~89 歳台で分離頻度が高い結果であった。*H. influenzae* の AMP 感受性の推移を Fig. 1B に示す。BLNAR は 2000 年度以降徐々に増加傾向を示し, 2006 年度では中間耐性株も合計すると半数を超える結果であった。一方で  $\beta$ -ラクタマーゼ産生株は減少傾向を示し, 2006 年には 1.8% であった。BLNAR の薬剤感受性結果を Table 1 に示す。piperacillin (PIPC) は良好な感受性を示した (MIC range  $<0.5 \sim 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ )。セフェム系抗菌薬では cefditoren pivoxil (CDTR-PI)

Table 1. The comparison of MICs against BLNAR isolated from lower respiratory tract

Antibiotics	MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		
	range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
PIPC	< 0.5-1	< 0.5	< 0.5
CDTR-PI	< 0.5	< 0.5	< 0.5
CTM	2-32 <	32 <	32 <
CTX	< 0.5-16	1	4
CAZ	0.125-8.0	< 0.5	2
CTRX	< 0.5-8	< 0.5	< 0.5
CFPM	< 0.5-4	2	4
IPM	< 0.5-8	2	8
BIPM	< 0.5-16	1	8
MEPM	< 0.5-1	< 0.5	< 0.5
DRPM	< 0.5-1	< 0.5	< 0.5
EM	2-32 <	8	16
CAM	4-32 <	8	16
AZM	< 0.5-8	1	2
LVFX	< 0.5-1	< 0.5	< 0.5
MFLX	< 0.5	< 0.5	< 0.5
GFLX	< 0.5	< 0.5	< 0.5

PIPC (piperacillin), CDTR-PI (cefditoren-pivoxil), CAZ (ceftazidime), CTRX (ceftriaxone), CTM (cefotiam), CTX (cefotaxime), CFPM (cefepime), MEPM (meropenem), DRPM (doripenem), IPM (imipenem), BIPM (biapenem), AZM (azithromycin), EM (erythromycin), CAM (clarithromycin), LVFX (levofloxacin), MFLX (moxifloxacin), GFLX (gatifloxacin)

(MIC range < 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), ceftazidime (CAZ) (MIC range < 0.5 ~ 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), ceftriaxone (CTRX) (MIC range < 0.5 ~ 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) は良好な感受性を有していた。一方, cefotiam (CTM) (MIC range 2 ~ 32 <  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), cefotaxime (CTX) (MIC range < 0.5 ~ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), cefepime (CFPM) (MIC range < 0.5 ~ 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の感受性は AMP 感受性株と比較し低下していた。カルバペネム系抗菌薬では meropenem (MEPM) (MIC range < 0.5 ~ 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), doripenem (DRPM) (MIC range < 0.5 ~ 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) は良好な感受性を示したが, imipenem (IPM) (MIC range < 0.5 ~ 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), biapenem (BIPM) (MIC range < 0.5 ~ 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の感受性は AMP 感受性株と比較し低下していた。マクロライド系抗菌薬では, azithromycin (AZM) (MIC range < 0.5 ~ 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) は良好な感受性を有していたが, erythromycin (EM) (MIC range < 2 ~ 32 <  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), clarithromycin (CAM) (MIC range < 4 ~ 32 <  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の感受性は AMP 感受性株と比較し低下していた。フルオロキノロン系抗菌薬では moxifloxacin (MFLX) (MIC range < 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), gatifloxacin (GFLX) (MIC range < 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) はすべて良好な感受性を有していたが, levofloxacin (LVFX) に関しては 1 株 MIC 1 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の菌株が認められた。

*H. influenzae* は成人市中肺炎の主要な原因菌である。近年,  $\beta$ -ラクタマーゼ非産生 AMP 耐性 *H. influenzae* (BLNAR) やフルオロキノロン耐性 *H. influenzae* など薬剤耐性菌の増加が問題視されている。従来,  $\beta$ -ラクタ

マーゼ産生株が主体であったため  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤配合ペニシリン系抗菌薬により治療可能であった。BLNAR を経口薬で治療する場合, 成人ではフルオロキノロン系抗菌薬, 限られたセフェム系抗菌薬などが考慮される。しかし, 成人市中肺炎の治療において経口フルオロキノロン系抗菌薬の処方増加に伴うフルオロキノロン耐性菌の増加も懸念され, 薬剤耐性 *H. influenzae* 分離率や, その薬剤感受性の動向を把握することは重要と考えられる。

今回検討した 2000 年から 2006 年までの 7 年間に当院で下気道呼吸器検体より分離された *H. influenzae* は, 小児より成人に多かった。また BLNAR の分離頻度は 80 ~ 89 歳の高齢者, 0 ~ 9 歳の幼小児期, および 30 ~ 39 歳に高かった。さらに全体では 2001 年頃より BLNAR が増加傾向を示し, 2006 年度には中間耐性株と合わせると 55.3% に達していた。薬剤感受性試験ではペニシリン系抗菌薬, セフェム系抗菌薬では PIPC, CAZ, CTRX の感受性は良好であり, CTM, CTX, CFPM の感受性は AMP 感受性株と比較し低下していた。カルバペネム系抗菌薬では, DRPM, MEPM は感受性良好であったが IPM, BIPM の感受性は AMP 感受性株と比較し低下していた。 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬間でこのように感受性の差が認められるのは PBP への親和性が大きく影響しているといわれている。*H. influenzae* の PBP は PBP1 ~ 7 まで存在し, BLNAR は特に PBP3A, 3B をコードする *ftsI* 遺伝子上のアミノ酸変異により  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の親和性, 特にセフェム系抗菌薬の親和性が低下すると報告されている<sup>4)</sup>。また, Morikawa らの報告では PIPC が BLNAR に良好な感受性を有している理由として高濃度で PBP3 に加えて PBP2 をも阻害するためと考えられている<sup>4,6)</sup>。また, MEPM が BLNAR に有効な理由として, 1 $\beta$ -メチル基の導入と塩基性 2 位側鎖の影響で PBP4, PBP5 への親和性が強くなるためと報告されている<sup>4,7)</sup>。さらに今回の検討では, マクロライド系抗菌薬で AZM のみ良好な有効性を示した。その理由として AZM は他のマクロライド系抗菌薬に比べグラム陰性菌に対する抗菌活性が高く, 菌体内への移行も良好であり殺菌的に作用するためと考えられている<sup>8)</sup>。一方, フルオロキノロン系抗菌薬はいずれも良好な感受性を有していた。近年, キノロン耐性 *H. influenzae* の報告が散見されるようになったが当院の検討でも LVFX に対する MIC が 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の菌株が 1 株認められた。キノロン耐性 *H. influenzae* は, 特に気管支拡張症など慢性呼吸器疾患を有する患者に対し繰り返しキノロン系抗菌薬を投与された場合や, 投与量が少なく有効血中濃度に達しない状態で投与が継続された場合などに注意が必要である。

また坂田らは小児科 150 名より分離された *H. influenzae* の注射用抗菌薬に対する薬剤感受性を検討している。その結果, 中間耐性株と耐性株を合計すると 56% にも達

しており、薬剤感受性では PIPC, CTRX, MEPM が優れ、著者らが検討したものと同様の傾向を示していた<sup>9)</sup>。小児、成人ともに重症インフルエンザ菌感染症に対し、経験的治療を行う際には BLNAR である可能性を十分考慮し、上記の  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬耐性菌にも有効な薬剤の使用が検討されるべきである。

BLNAR を含め *H. influenzae* の薬剤耐性を抑制するためには、適切な抗菌薬の選択、および良好な抗菌力に加え耐性を誘導しにくい優れた経口抗菌薬の開発、ワクチンによる予防などを行うことが重要と考えられる。また、*H. influenzae* の小児から成人への伝搬<sup>10)</sup>や、院内感染例<sup>11)</sup>も報告されており、感染予防対策も耐性菌の拡大防止のために必要かもしれない。*H. influenzae* の薬剤耐性は現在も進行しているため今後もその動向には十分注意が必要である。

#### 文 献

- 1) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15<sup>th</sup> Informational Supplement. Document M100-S15, 2005
- 2) Ohkusu K, Nakamura A, Sawada K: Antibiotic resistance among recent clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in Japanese children. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 36: 249-54
- 3) Seki H, Hasahara Y, Ohta K, Saikawa R, Sumita A, Yachie A, et al: Increasing prevalence of ampicillin-resistant, non-beta-lactamase-producing strains of *Haemophilus influenzae* in children in Japan. *Chemotherapy* 1999; 45: 15-21
- 4) Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, et al: Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistant in  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1693-9
- 5) Dworkin M S, Park L, Borchardt S M: The changing epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* disease, especially in person  $\geq$  65 years old. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 810-6
- 6) Morikawa Y, Kitazato M, Mitsuyama J, Mizunaga S, Minami S, Watanabe Y: In vitro activities of piperacillin against  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1229-34
- 7) Kanazawa K, Nouda H, Sunagawa M: Structure activity relationships of carbapenem compounds to anti-*Haemophilus influenzae* activity and affinity for penicillin-binding proteins. Effect of 1 beta-methyl group and C-2 side chain. *Journal of Antibiotics* 1997; 50: 162-8
- 8) Goldstein F W, Emirian M F, Coutrot A, Acar J F: Bacteriostatic and bactericidal activity of azithromycin against *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* 1990; 25: 25-8
- 9) 坂田 宏: 小児の呼吸器感染症患者から分離された *Haemophilus influenzae* の注射用抗菌薬に対する薬剤感受性。日化療会誌 2003; 51: 569-73
- 10) Watanabe H, Hoshino K, Sugita R, Asoh N, Watanabe K, Oishi K, et al: Possible high rate of transmission of nontypeable *Haemophilus influenzae*, including beta-lactamase-negative ampicillin-resistant strains, between children and their parents. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 362-5
- 11) Van Dort M, Walden C, Walker E S, Reynolds S A, Levy F, Sarubbi F A: An outbreak of infections caused by non-typeable *Haemophilus influenzae* in an extended care facility. *J Hosp Infect* 2007; 66: 59-64

The prevalence of  $\beta$ -lactamase non-producing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* (BLNAR) isolated from respiratory samples and investigation of the susceptibility trends in Nagasaki University Hospital from 2000 to 2006

Shigeki Nakamura<sup>1)</sup>, Katsunori Yanagihara<sup>1,2)</sup>, Yoshitomo Morinaga<sup>1,2)</sup>, Takayoshi Kiya<sup>2)</sup>,  
Junichi Matsuda<sup>2)</sup>, Koichi Izumikawa<sup>1)</sup>, Masafumi Seki<sup>1)</sup>, Hiroshi Kakeya<sup>1)</sup>,  
Yoshihiro Yamamoto<sup>1)</sup>, Takayoshi Tashiro<sup>1,3)</sup>, Simeru Kamihira<sup>2)</sup> and Shigeru Kohno<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University Hospital, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki, Japan

<sup>2)</sup> Department of Laboratory Medicine, Nagasaki University Hospital

<sup>3)</sup> School of Health Sciences, Nagasaki University Hospital

The prevalence of strains with ampicillin(AMP) resistance among *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) isolated from the lower respiratory tract has been increasing significantly during the 7 years from 2000, when it was 0%, to 2005, when it reached 29.7%. From 2006, the ratio of  $\beta$ -lactam resistant strains, which is  $\beta$ -lactamase non-producing AMP-resistant *H. influenzae*(BLNAR) strains with a minimum inhibitory concentration(MIC) of AMP of over 4  $\mu$ g/mL and intermediate strains (MIC of AMP; 2  $\mu$ g/mL), exceeded 50%. The prevalence of beta-lactamase positive strain has been decreasing from levels reported in previous studies to 1.8% in 2006. We measured the drug susceptibility test of BLNAR isolated from 2000–2006 to several currently approved antimicrobial agents. Piperacillin, ceftazidime, ceftriaxone had good potency, but the susceptibility of cefotiam, cefotaxime, cefepime were decreased. Meropenem and doripenem had good susceptibility, but imipenem and biapenem revealed low susceptibility. Azithromycin is the most effective drug in macrolides. All fluoroquinolones (levofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin) had good potency against *H. influenzae*, but one strain was levofloxacin low-susceptible (MIC = 1.0  $\mu$ g/mL). BLNAR has been increasing rapidly not only in pediatric but also respiratory tract medicine. It is important to realize the trends of drug resistant pathogens and effective antimicrobial agents, especially against BLNAR because there is difference of the drug susceptibility during the same groups.