

フルオロキノロン耐性 *Streptococcus pneumoniae* の 検出状況と分子疫学的検討

¹⁾札幌医科大学医学部微生物学講座, ²⁾北海道和光純薬, ³⁾北海道大学病院検査部

横田 伸一¹⁾ 佐藤 清¹⁾²⁾ 吉田 繁³⁾ 藤井 暢弘¹⁾

(平成 16 年 1 月 22 日受付)

(平成 16 年 3 月 5 日受理)

Key words : *Streptococcus pneumoniae*, fluoroquinolone, drug resistance,
DNA gyrase, topoisomerase IV

要 旨

1999 年から 2003 年の間に北海道の民間臨床検査センターおよび基幹病院検査部細菌検査室にて各種臨床検体から分離された *Streptococcus pneumoniae* 670 株について, levofloxacin, ciprofloxacin に対する耐性を指標にフルオロキノロン耐性株をスクリーニングし, 11 株の耐性株が認められた. これら分離株について tosufloxacin, sparfloxacin, gatifloxacin 感受性もさらに検討したところ 10 株がいずれの薬剤にも耐性を示した. *gyrA*, *parC*, *parE*, *gyrB* 遺伝子の解析を行ったところ耐性度の高い 8 株で 2 つの遺伝子(*gyrA* と *parC*, もしくは *gyrA* と *parE*)に耐性に関与する変異が, 残り 3 株は 1 つの遺伝子(*parC*)に耐性変異が認められた. 変異パターンの株間での多様性や random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) による遺伝子解析の結果から, 耐性株は, 特定の株が広がっているのではなく, 散発的に発生していることが示唆された. 患者年齢との関係では, 20 歳未満患者由来の菌株 574 株では耐性株が 1 株も認められなかったのに対して, 60 歳以上では 60 株中 9 株 (15.0%) と高い頻度で耐性株が分離された. 日本ではノルフロキサシン以外のフルオロキノロン薬が小児に対して禁忌とされていることによるものと考えられる.

[感染症誌 78: 428~434, 2004]

序 文

肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) は, 小児の中耳炎や副鼻腔炎の代表的な起炎菌である. 髄膜炎や高齢者を中心とした市中肺炎の起炎菌としても重要である. 近年, β -ラクタム系抗菌薬に対する耐性が penicillin-resistant *S. pneumoniae* (PRSP) あるいは penicillin-intermediate *S. pneumoniae*

(PISP) と呼ばれ, 問題となっている. β -ラクタム系薬のみならず, マクロライド, テトラサイクリン, クロラムフェニコールなどとの交叉耐性も広がっており, drug-resistant *S. pneumoniae* (DRSP) という呼称が提唱されるに至っている.

フルオロキノロン系抗菌薬に対する耐性化は *S. pneumoniae* ではあまり進んでいないとされている¹⁾. しかし, 最近の我々の成績ではフルオロキノロン耐性は成人, 特に高齢者, 由来の分離株で進んでいることが明らかとなった²⁾. 今回, 以前の我々の検討²⁾からさらに菌株数をふやし, 前報の 7

別刷請求先: (〒060-8556) 北海道札幌市中央区南 1

条西 17 丁目

札幌医科大学医学部微生物学講座

藤井 暢弘

株に新たに4株を加えた11株のフルオロキノロン耐性株をスクリーニングによって見出した。これらについて5剤のフルオロキノロン系抗菌薬に対するMICの測定を実施、さらに耐性機構解析のためキノロン系抗菌薬のターゲットであるDNA gyrase (GyrA, GyrBのサブユニットから構成される), topoisomerase IV (ParC, ParEのサブユニットから構成される)³⁾の各遺伝子のキノロン耐性決定領域 (quinolone resistance-determining region: QRDR)の遺伝子配列解析を行った。今回はさらに、ペニシリン結合蛋白質 (PBP) 遺伝子の変異およびマクロライド耐性遺伝子の有無をあわせて解析した。また random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) によって耐性分離株間の異同についても検討した。

対象および方法

1. 菌株

1999年から2003年までに、北海道内で分離された *S. pneumoniae* 株670株を対象とした。分離施設は、基幹病院検査部細菌検査室 (北海道大学病院, 市立室蘭総合病院) および民間の臨床検査センター (札幌臨床検査センター, 第一臨床検査センター, 北海道 SRL) である。菌株の分離材料は、鼻汁396検体、喀痰140検体、耳漏47検体、咽頭液46検体、血液16検体、鼻粘膜12検体、眼脂8検体、肺胞洗浄液2検体、髄液、胸水、関節液各1検体である。*S. pneumoniae* の同定は、MicroScan WalkAway40 (Dade Behring) によった。さらに、オートリシン遺伝子のPCRによる検出⁴⁾とオプトヒン感受性によって *S. pneumoniae* であることの確認を行った。

2. 抗菌薬感受性

被験薬剤はフルオロキノロン5剤 [levofloxacin (LVFX: 第一製薬), ciprofloxacin (CPFX: バイエル), tosufloxacin (TFLX: アボット), sparfloxacin (SPFX: 大日本製薬), gatifloxacin (GFLX: 杏林製薬)], penicillin G (PCG: 明治製薬) および erythromycin (EM: 大日本製薬) を使用した。最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は5% ヒツジ脱繊血添加ミューラーヒントン寒天培地を用いて、

日本化学療法学会標準法に準拠した寒天平板希釈法⁵⁾により行った。

薬剤排出機構による耐性の評価は、薬剤排出系の阻害剤である reserpine^{6,7)}を10 µg/mlの濃度で培地に添加し、MICへの影響で検討した。4倍以上の差が認められた場合、有意であるとした。

3. 薬剤耐性遺伝子解析

菌のゲノムDNAは、千葉らの方法⁸⁾に従って抽出した。キノロン薬のターゲットであるDNA gyrase サブユニット遺伝子 (*gyrA*, *gyrB*), topoisomerase IV サブユニット遺伝子 (*parC*, *parE*) のQRDRを含む遺伝子断片をPanらの報告⁸⁾にあるプライマーセットおよびHotStarTaq DNA polymerase (QIAGEN) を用いてPCRによって得た後、ダイレクトシーケンス法で遺伝子配列を決定した。シーケンシング反応はDY-Enamic Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Bioscience) を、シーケンサーはABI PRISM model 377 (Applied Biosystems) を用いた。上記プライマーによって増幅できなかった2株の *parC* については、Ferrándizの報告⁹⁾にあるプライマーを用い、全長の遺伝子を得て、塩基配列解析を行った。

PBP 遺伝子 (*pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b*) の遺伝子変異および、マクロライド耐性遺伝子 *erm* (B), *mef* (A) の検出は千葉らのPCR法⁴⁾に従って行った。

4. RAPD-PCR

菌のゲノムDNAはセパジーン (三光純薬) を用いて抽出した。プライマーはRAPD Analysis Primer Set (Amersham Bioscience) 中の5種: P1, 5'-GGTGCGGGA-3'; P2, 5'-GTTTCGCTCC-3'; P4, 5'-AAGAGCCCGT-3'; P5, 5'-AACGCGCAAC; P6, 5'-CCCGTCAGCA-3'を用いた。PCR反応はHotStarTaq DNA polymeraseを用い、GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) で行った。テンプレートDNA 20 ngを用い、94℃, 2分/38℃, 2分/72℃, 2分を35サイクル、最後に72℃, 10分のインキュベーションを行った。反応生成物を1.5% アガロース電気泳動で解析した。

成 績

670株のうちフルオロキノロン耐性株は11株

Table 1 Characterization of eleven fluoroquinolone resistant strains

Strain	Age	Sex	Source	Place of isolation	MIC (μg/ml)								Mutation in quinolone resistance-determining region				Mutation in PBP genes §			Presence of macrolide resistant genes ¶
					PCG	EM	CPFX	LVFX	TFLX	SPFX	GFLX	ParC	GyrA	ParE	GyrB	<i>pbp1a</i>	<i>pbp2x</i>	<i>pbp2b</i>	<i>erm</i> (B)	
DR22	72	M	sputum	Sapporo	8	4	> 32	> 32	> 32	> 32	8	Ser79→Phe	Ser81→Ala	none	none	+	+	+	+	
SR68*	33	M	sputum	Bihoro	2	0.25	32	> 32	8	32	32	Asp83→Tyr [†]	Ser81→Phe	Ile460→Val	none	+	+	+	−	
SR27*	85	F	sputum	Sapporo	8	0.13	16	32	8	8	8	Ser52→Gly, Ser79→Arg, Asn91→Asp, Glu135→Asp	Ser84→Phe, Ser114→Gly	Ile460→Val	none	+	+	+	−	
SR179*	78	M	sputum	Sapporo	8	0.13	16	8	4	8	4	Ser52→Gly, Ser79→Arg, Asn91→Asp, Glu135→Asp	Ser81→Phe, Ser114→Gly	Ile460→Val	none	+	+	+	−	
HU85*	22	M	articular fluid	Sapporo	0.03	16	16	16	4	8	8	none	Ser81→Phe	Asp435→Asn, Ile460→Val	none	−	+	−	+	
SR248	63	M	sputum	Hakodate	1	0.5	16	8	16	8	4	Asp83→Asn	Ser81→Ala	none	none	+	−	−	+	
HU86*	73	F	sputum	Sapporo	0.03	64	16	16	2	8	8	none	Ser81→Tyr	Asp435→Asn	none	−	−	−	+	
MH67	68	M	sputum	Muroran	0.13	0.25	16	16	2	4	4	none	Ser81→Phe	Asp435→Asn, Ile460→Val	none	−	−	−	−	
SR69*	88	F	sputum	Kushiro	4	8	16	8	2	1	4	Ser79→Phe	none	Ile460→Val	none	+	+	+	−	
SR211	73	F	rhinorrhea	Asahikawa	1	2	8	8	1	2	2	Ser79→Phe	none	Ile460→Val	none	+	+	−	+	
SR166*	71	M	sputum	Kushiro	2	16	8	2	0.5	0.25	1	Asp83→Tyr	none	Ile460→Val	none	+	+	+	−	

Abbreviations of antibiotics : PCG, penicillin G ; EM, erythromycin ; CPFX, ciprofloxacin ; LVFX, levofloxacin ; TFLX, tosufloxacin ; SPFX, sparfloxacin ; GFLX, gatifloxacin.

* , Data are taken from previous paper²⁾.† , This mutation was newly identified after repetitive single colony isolation in this study, however, this was not found in previous paper²⁾.

§ , + : mutations are found ; - : mutations are not found.

¶ , + : gene is detected ; - : gene is not detected.

Table 2 Summary of mutations contributing fluoroquinolone resistance in *parC*, *gyrA* and *parE*

Fluoroquinolone target gene	Amino acid residue and its codon in standard strain R6	Mutation	Strains possessing the mutation
<i>parC</i>	Ser79 (TCT)	Phe (TTT)	DR22, SR69, SR211
		Arg (AGA)	SR27, SR179
	Asp83 (GAT)	Tyr (TAT)	SR68, SR166
		Asn (AAT)	SR248
<i>gyrA</i>	Ser81 (TCC)	Phe (TTC)	SR68, SR27, SR179, HU85, MH67
		Ala (GCC)	DR22, SR248
		Tyr (TAC)	HU86
<i>parE</i>	Asp435 (GAC)	Asn (AAC)	HU85, HU86, MH67

認められた (Table 1). 耐性の程度は菌株によって様々であった。このうち、DR22 株は GFLX 以外のフルオロキノロン薬に 32 µg/ml 以上と非常に高い耐性を示した。11 株中 PRSP, PISP は各々 4 株 (計 72.7%) であった。マクロライド交叉耐性は 7 株 (63.6%) に認められた。

これまでの報告^{10)~14)}を参考にして、耐性に関わる変異を Table 2 にまとめた。耐性度の高い 8 株で 2 つの遺伝子 (*gyrA* と *parC*, もしくは *gyrA* と *parE*) に耐性に関与する変異が、残り 3 株は 1 つの遺伝子 (*parC*) に変異が認められた。2 つの遺伝子に変異が認められた 8 株は、*parC* のみに耐性変異の認められた 3 株に比べて耐性度が高い傾向にあった。TFLX, SPFX, GFLX といったグラム陽性菌に対する効力の高い薬剤でも、CPFV や LVFX よりも低い MIC ではあるが、2 つの耐性変異を持つ株を中心に耐性を示していた。耐性変異のうち、DR22 株と SR248 株で認められた *gyrA* の Ser81 (TCC) → Ala (GCC) は、今回初めて認められた変異パターンである。多くの菌株で認められる *parE* の Ile460 (ATC) → Val (GTC) の変異は感受性株でも認められるものであり、Pestova らの報告¹⁰⁾にもあるとおり、耐性変異とは無関係と考えられる。

S. pneumoniae では、topoisomerase IV, DNA gyrase の QRDR 中の変異以外に薬剤排出系による耐性機構が知られている^{6) 7)}。薬剤排出系の阻害剤である reserpine のフルオロキノロン耐性への影響を検討したところ、SR166 株の CPFV に対する MIC のみが有意な影響を受けた (8→2 µg/

ml)。この結果は、検討菌株中 SR166 の CPFV 耐性のみで部分的に薬剤排出系の関与があることを示唆している。

RAPD-PCR による遺伝子解析により菌株の異同を確認した。その結果、SR27 と SR179 の 1 組のみが、検討した 5 種類のプライマーで全て同じパターンを示したことにより、同一株由来であると考えられたが、それ以外は異なる由来の菌株であることが示唆された (Fig. 1)。SR27 と SR179 は耐性遺伝子のパターン (QRDR の DNA シーケンス, 3 種の PBP 遺伝子の変異, 2 種のマクロライド耐性遺伝子陰性) が同一であり、薬剤感受性も類似していた (Table 1)。

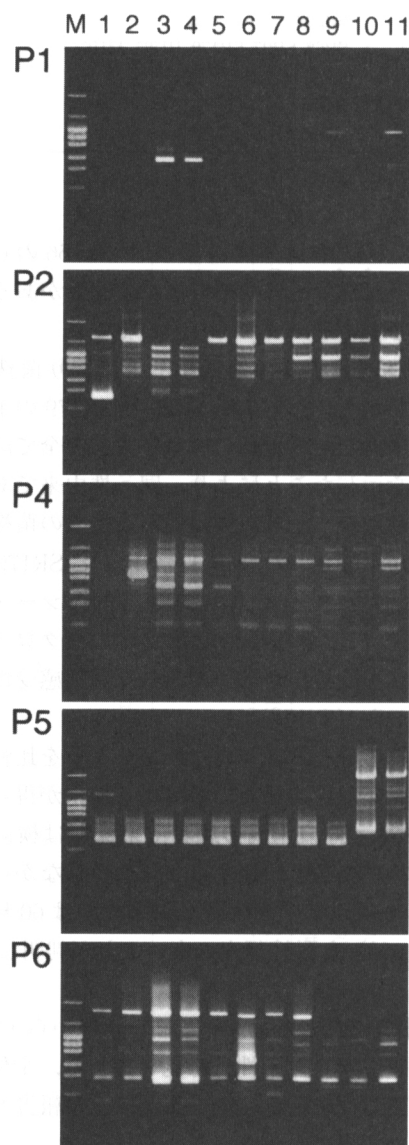
耐性株の分布と種々のパラメーターを比較したところ、年齢別の分布で興味ある結果が得られた (Table 3)。20 歳未満の患者由来株では検討した 574 株の中に 1 株も耐性株は認められなかった。一方、60 歳以上の高齢者層由来株では 60 株中 9 株 (15.0%) と耐性頻度の高いことが判明した。

考 察

670 株の *S. pneumoniae* 臨床分離株から 11 株のフルオロキノロン耐性株を見出した。全体としての頻度は 1.6% であり、これまでの報告と類似して低いものであった。

耐性変異のパターンには非常に多様性が認められた (Table 1, 2) ことから、フルオロキノロン耐性株の出現は単一の耐性菌株の拡大ではないことが予想された。実際に RAPD-PCR により遺伝子解析したところ 1 組の 2 株をのぞいては RAPD のパターンが異なり (Fig. 1), 異なる菌株に由来し

Fig. 1 RAPD-PCR analysis of eleven fluoroquinolone-resistant *S. pneumoniae* strains with five distinct primers (P1, P2, P4, P5, and P6). Lanes 1: DR22, 2: SR68, 3: SR27, 4: SR179, 5: HU85, 6: SR248, 7: HU86, 8: MH67, 9: SR69, 10: SR211, 11: SR166, M: pHY molecular size marker.



ていることが示唆された。すなわち、フルオロキノロン耐性 *S. pneumoniae* は現在のところ基本的には散発的に発生していると考えられる。唯一同一株と推定された SR27 と SR179 に関しては同一

Table 3 Relation between patient age and prevalence of fluoroquinolone-resistant *S. pneumoniae* isolates

Age	No. of FQ resistant strains/ No. of strains	Frequency of emergence (%)
0 to 9	0/568	0%
10 to 19	0/6	0%
20 to 59	2/36	5.6%
more than 60	9/60	15.0%
total	11/670	1.6%

施設の分離株であり、院内感染を疑わせる事例である。この菌株の *parC*, *gyrA* 遺伝子は *S. pneumoniae* のゲノム標準株 R6 の遺伝子配列との相違が非常に多く認められる²⁾。おそらくそのために *parC* に関しては通常我々が用いている QRDR の遺伝子断片を得るためのプライマーでは増幅産物が得られなかったと考えられる。以前の配列解析²⁾から部分的に緑色レンサ球菌のそれらに類似する塩基配列が認められている。同じ *Streptococcus* 属である *S. pneumoniae* と緑色レンサ球菌との間で遺伝子交換が起きることは、ペニシリン結合蛋白遺伝子などでよく知られており、これが β -ラクタム系抗菌薬耐性の主要な機構であることが提唱されている¹⁵⁾。今回の検討では、SR27, SR179 以外には少なくとも topoisomerase IV, DNA gyrase の QRDR に緑色レンサ球菌に由来すると思われる配列が見つからない (data not shown) ことから、フルオロキノロン耐性の場合、緑色レンサ球菌との遺伝子交換は重要な耐性機序ではないと考えられる。

β -ラクタム系やマクロライド系抗菌薬耐性と比較して、フルオロキノロン系抗菌薬耐性が最も大きく異なる点はその耐性頻度が著しく低いことであるが、さらにその耐性株出現率は年齢層によって著しい偏りがある。このようなフルオロキノロン耐性株出現の年齢層による差は、海外でも類似の例が報告されている¹⁶⁾¹⁷⁾。今回、*S. pneumoniae* の分離頻度が高い小児由来株には、耐性株は全く認められなかった。おそらくノルフロキサシン以外のフルオロキノロンが我が国では小児に対して

禁忌とされ、ほとんど使用されていないからであろう。60歳以上の高齢者では15%程度の耐性頻度である。これもβ-ラクタム系やマクロライド系に比較すると低い頻度であるが、高齢者層を中心に確実に耐性が進んでいることを示している。11株のうち8株は、少なくとも二つの遺伝子に耐性変異が認められ、抗 *S. pneumoniae* 活性が高いとされる SPFX, TFLX, GFLX にも高度耐性を示している。2000年3月に発表された日本呼吸器学会の“呼吸器感染症に関するガイドライン”¹⁸⁾においては、*S. pneumoniae* を中心とした薬剤耐性の増加を防ぐ目的もあり、フルオロキノロンとカルバペネムを第一選択薬にはあげておらず、本当に必要と認められる症例に使用を限定しようとしている。今回の我々の成績はまさにフルオロキノロン耐性が薬の使用に依存していることを示唆している。また、PRSP, PISP やマクロライド耐性株のように広がりを見せていないもうひとつの要因として、*S. pneumoniae* の感染経路を考慮すべきと考ええる。Hoshino らの報告¹⁹⁾、杉田の総説²⁰⁾では、*S. pneumoniae* の家族内感染、特に子供から親(大人)への感染、の重要性が指摘されている。高齢者層を中心にフルオロキノロン耐性が生じている現状よりも、仮に小児層に耐性株が侵入した場合、市中での拡大速度がより増すことが危惧される。

謝辞：菌株の蒐集に御協力戴いた市立室蘭総合病院松田啓子、林右、北海道大学病院検査部秋沢宏次、札幌臨床検査センター桑原理、幅寺敏、第一臨床検査センター小林和彦、上野了、北海道 SRL 塚本尚行、大内裕敬各氏(敬称略)に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 山口恵三、宮崎修一、樫谷総子、岩田守弘、レボフロキサシン—サーベイランスグループ：1998年に全国26施設から分離された臨床分離株5,180株の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス。Jpn J Antibiot 2000；53：387—408。
- 2) Yokota S, Sato K, Kuwahara O, Habadera S, Tsukamoto N, Ohuchi H, et al. : Fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains occur frequently in elderly patients in Japan. Antimicrobiol Agents Chemother 2002；46：3311—5。
- 3) 山岸純一、清水當尚：キノロン系薬耐性の分子遺伝学。日化療会誌 2001；49：469—83。
- 4) 千葉菜穂子、小林玲子、長谷川恵子、生方公子、紺野昌俊：肺炎球菌に対するカルバペネム系薬の抗菌作用の比較。日化療会誌 2002；50：161—70。
- 5) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について。Chemotherapy 1981；29：76—9。
- 6) Markham PN : Inhibition of the emergence of ciprofloxacin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by the multidrug efflux inhibitor reserpine. Antimicrob Agents Chemother 1999；43：988—9。
- 7) Beyer R, Pestova E, Millichap JJ, Stosor V, Noskin GA, Peterson LR : A convenient assay for estimating the possible involvement of efflux of fluoroquinolones by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* : evidence for diminished moxifloxacin, sparfloxacin, and trovafloxacin efflux. Antimicrob Agents Chemother 2000；44：798—801。
- 8) Pan X-S, Ambler J, Mehtar S, Fisher LM : Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1996；40：2321—6。
- 9) Ferrándiz MJ, Fenoll A, Liñares J, De La Campa AG : Horizontal transfer of *parC* and *gyrA* in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2000；44：840—7。
- 10) Pestova E, Beyer R, Cianciotto NP, Noskin GA, Peterson LR : Contribution of topoisomerase IV and DNA gyrase mutations in *Streptococcus pneumoniae* to resistance to novel fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother 1999；43：2000—4。
- 11) Perichon B, Tankovic J, Courvalin P : Characterization of a mutation in the *parE* gene that confers fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1997；41：1166—7。
- 12) Pan X-S, Fisher LM : DNA gyrase and topoisomerase IV are dual targets of clinafloxacin action in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1998；42：2810—6。
- 13) Jorgensen JH, Weigel LM, Ferraro MJ, Swenson JM, Tenover FC : Activities of newer fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates including those with mutations in the *gyrA*, *parC*, and *parE* loci. Antimicrob Agents Chemother 1999；43：329—34。
- 14) 福田秀行：*Streptococcus pneumoniae* におけるキノ

- ロン系薬の作用機序に関する遺伝学的解析. 日化療会誌 2000 ; 48 : 243—50.
- 15) Spratt BG : Resistance to antibiotics mediated by target alternations. *Science* 1994 ; 264 : 388—93.
 - 16) Chen DK, McGeer A, de Azavedo JC, Low DE : Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. *N Engl J Med* 1999 ; 341 : 233—9.
 - 17) Karlowsky JA, Thornsberry C, Critchley IA, Jones ME, Evangelista AT, Noel GJ, *et al.* : Susceptibilities to Levofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* clinical isolates from children : results from 2000-2001 and 2001-2002 TRUST studies in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 ; 47 : 1790—7.
 - 18) 日本呼吸器学会市中肺炎診療ガイドライン作成委員会 : 成人市中肺炎診療の基本的考え方. 日本呼吸器学会, 東京, 2000.
 - 19) Hoshino K, Watanabe H, Sugita R, Asoh N, Ntaguzi SA, Watanabe K, *et al.* : High rate of transmission of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* between parents and children. *J Clin Microbiol* 2002 ; 40 : 4357—9.
 - 20) 杉田麟也 : ペニシリン耐性肺炎球菌感染症に対する実地医療の現状. 日化療会誌 2003 ; 51 : 409—18.

Molecular Epidemiology of Fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Japan

Shin-ichi YOKOTA¹⁾, Kiyoshi SATO¹⁾²⁾, Shigeru YOSHIDA³⁾ & Nobuhiro FUJII¹⁾

¹⁾Department of Microbiology, Sapporo Medical University School of Medicine,

²⁾Hokkaido Wako Junyaku Co., Ltd,

³⁾Laboratory Medicine, Hokkaido University Hospital

We identified fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains among 670 clinical isolates isolated from 1999 to 2003 in Hokkaido prefecture, Japan. All eleven strains were resistant to ciprofloxacin and levofloxacin. Furthermore, ten strains were also resistant to fluoroquinolones that are more effective with gram-positive bacteria, namely tosufloxacin, sparfloxacin, and gatifloxacin. Nucleotide sequence analysis of the quinolone-resistance determining region (QRDR) of the quinolone target genes coding for topoisomerase IV subunits (*parC* and *parE*) and DNA gyrase subunits (*gyrA* and *gyrB*). Eight strains, which showed higher resistance, had resistance mutations in two genes (*gyrA* and *parC*, or *gyrA* and *parE*), and other three strains had one resistance mutation in *parC*. The mutation patterns were varied between the strains. Data from random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) indicated that eleven strains were identified as ten independent clones. Lines of evidence indicated that genetic mutations leading to fluoroquinolone resistance occur sporadically rather through the spreading of a particular resistant strain. Notably, the fluoroquinolone-resistant strains were only isolated from adults, particularly from patients more than 60 years of age (9/60 strains ; 15.0%). Resistant strains were not found in 574 strains isolates from patients under 20 years of age. This may be due to the fact that fluoroquinolones other than norfloxacin are not applicable to children in Japan.