

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08171

研究課題名（和文）小児由来Mycoplasma pneumoniaeにおける抗菌薬耐性機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of antibiotics resistance in Mycoplasma pneumoniae among children

研究代表者

大石 智洋（Oishi, Tomohiro）

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：80612770

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：小児マイコプラズマ感染症につき、本年度もこれまで通り、研究を進めた。ここ数年同様に、新型コロナウイルスの影響で、症例数は激減していたが、2023年末よりようやく症例が出始め、2024年3月までに陽性例計5例検出された。検出数が少ない間、長年の懸念であった、マクロライド耐性株の発生機構の実験として、アジスロマイシン暴露によるマクロライド耐性発現を証明し、英文誌に掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マクロライド耐性株の発生機構の実験について論文掲載され、社会に抗菌薬適正使用の重要性につき、問いかけることができた。

また、小児マイコプラズマ感染症の疫学調査を継続することで、その傾向や注意点などを、社会に発信できることも、貢献できるポイントと考えた。

研究成果の概要（英文）：We performed our research on pediatric Mycoplasma pneumoniae infections as before. The number of isolates of Mycoplasma pneumoniae were very small for a while. However, it was increasing from December 2023, and we collected 5 strains isolated from Japanese Children.

Furthermore, we investigated the mechanism of macrolide resistance in Mycoplasma pneumoniae, and we submitted to the English Journal and our report was printed on it.

研究分野：小児マイコプラズマ感染症

キーワード：マイコプラズマ マクロライド 耐性 小児

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Mycoplasma pneumoniae 感染症は、COVID-19 の流行後、当初は 2020 年に流行が予想されていたが、流行はなかった。

しかしながら、次第に感染対策が緩和していくにつれ、再度の流行拡大が危惧されていた。

2. 研究の目的

Mycoplasma pneumoniae 感染症が落ち着いているが、それまで治療薬であるマクロライド系抗菌薬に対する耐性を示す株が問題視されていた。

しかし、そもそもなぜマクロライド耐性 *M. pneumoniae* が出現したか、その原因はいまだ明らかになっていなかった。

そこで、マクロライド耐性 *M. pneumoniae* が出現する原因は、マクロライド系薬の暴露による耐性の誘導と考え、この仮説を証明するための実験を施行することを考えた。

具体的には、アジスロマイシン (AZM) は半減期が長く、低濃度の暴露が耐性菌を生じるのではないかと考えた。

3. 研究の方法

M. pneumoniae のうち、既にアジスロマイシン¹ (AZM マクロライド系薬) に対する MIC (最小発育阻止濃度) が判明している以下の、マクロライド感受性株を準備する。

Strain No.	Isolation Date	Mutations	MICs of AZM (µg/mL)	P1 Type
FH (standard strains)	-	-	0.001	2
M1601	Jul-2019	-	0.0005	2
M1603	Aug-2019	-	0.001	2g2
M1611	Nov-2019	-	0.001	2g2
M1613	Nov-2019	-	0.001	2g2
M1634	Jun-2020	-	0.00012	2g2
M1644	Sep-2020	-	0.0005	2g2

AZM を 0.0001 ~ 0.004 µg/mL に設定した以下の PLO 液体培地に、準備した菌株を 150 µL 接種する。



で接種した菌株のうち、元の MIC よりも上昇した菌株があれば、その株についてシーケンシングを行う。

シーケンシングにて、マクロライド耐性遺伝子変異のあった株につき、MIC 測定を行う。

*シーケンシング: *M. pneumoniae* ドメインファイブの 1801 番 ~ 2905 番の領域のシーケンシングを行う

4. 研究成果

6 株中 4 株で、暴露前の MIC よりも高い AZM 薬剤濃度 (0.0004 µg/mL) に発育

この 4 株につきシーケンシングしたところ、2 株において C2617A および C2617G 変異を検出。

Strain No.	Maximal Concentrations (Strains Grew)	Mutations	Original MICs of AZM (µg/mL)
FH (standard strains)	No growth	Not possible	0.001
M1601	0.004	C2617G	0.0005
M1603	0.004	-	0.001
M1611	0.004	-	0.001
M1613	0.004	C2617A	0.001
M1634	No growth	Not possible	0.00012
M1644	No growth	Not possible	0.0005

AZM: azithromycin. MIC: minimum inhibitory concentrations. * Exposure of low-concentration azithromycin: Exposure with the PLO broth including AZM at the concentrations from 0.002 to 1.6 g/mL, higher concentrations than the original MICs of AZM

上記4株につき、再度 AZM 低濃度暴露を実施した。
 初回の AZM 暴露にて発育がみられ、発育した菌株4株につき、再度 AZM 低濃度暴露を実施した。
 AZMの濃度は、前回発育した濃度より高い濃度 (0.008~16 µg/mL) で設定した。
 培養後 28 日まで観察したところ、4 株のうち、初回暴露後に遺伝子変異を認めた 2 株において、
 高濃度の AZM (128 及び 16 µg/mL) で発育を認めた。
 (初回で変異の見られなかった 2 株は発育見られず)この 2 株のシーケンス解析にて、A2063G
 変異、C2617A 変異を認めた

Table 3. Changes in the mutations of *Mycoplasma pneumoniae* after the second exposure of low-concentration azithromycin.

Strain No.	Maximal Concentrations (Strains Grew)	Mutations	Last Mutations
M1601	128	A2063G	C2617G
M1603	No growth	Not possible	-
M1611	No growth	Not possible	-
M1613	16	C2617A	C2617A

2 回の低濃度暴露でいずれも発育の見られた 2 株について、AZM の MIC を測定した。
 いずれの株も、低濃度暴露前よりも明らかに MIC が上昇した
 A2063G 変異株 : 0.0005 µg/mL 128 µg/mL
 C2617A 変異株 : 0.001 µg/mL 0.0156 µg/mL

Table 4. MICs of azithromycin for *Mycoplasma pneumoniae* after the second exposure to low-concentration azithromycin.

Strain No.	MICs of AZM (µg/mL)	Mutations	Original MIC (µg/mL)
M1601	128	A2063G	0.0005
M1613	0.0156	C2617A	0.001

AZM: azithromycin. MIC: minimum inhibitory concentrations.

以上の結果につき、Microorganism 誌に投稿し、採択され、以下の通り掲載された。

Oishi T, Hattori N, Yoshioka D. Novel Knowledge of Macrolide Resistance in *Mycoplasma pneumoniae* by Azithromycin Exposure. *Microorganisms*. 2024 Jan 21;12(1):218. doi: 10.3390/microorganisms12010218.PMID: 38276204

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Oishi Tomohiro, Yoshioka Daisuke, Nakano Takashi, Ouchi Kazunobu	4. 巻 10
2. 論文標題 Recent Trend of Antimicrobial Susceptibility among Mycoplasma pneumoniae Isolated from Japanese Children	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 2428 ~ 2428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms10122428	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oishi Tomohiro, Ouchi Kazunobu	4. 巻 11
2. 論文標題 Recent Trends in the Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Macrolide-Resistant Mycoplasma pneumoniae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1782 ~ 1782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11071782	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomohiro Oishi, Kazunobu Ouchi	4. 巻 11
2. 論文標題 Recent Trends in the Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Macrolide-Resistant Mycoplasma pneumoniae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1782-1782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshitaka Nakamura, Tomohiro Oishi, Kazunari Kaneko, Tsuyoshi Kenri, Takaaki Tanaka, Shoko Wakabayashi, Mina Kono, Sahoko Ono, Atsushi Kato, Eisuke Kondo, Yuhei Tanaka, Hideto Teranishi, Hiroto Akaike, Ippei Miyata, Satoko Ogita, Naoki Ohno, Takashi Nakano, Kazunobu Ouchi	4. 巻 2
2. 論文標題 Recent acute reduction in macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae infections among Japanese children	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 271-276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2020.10.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大石 智洋
2. 発表標題 マイコプラズマ感染症の遺伝子学的検査法
3. 学会等名 第235回 大阪小児科医会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大石智洋
2. 発表標題 小児におけるマイコプラズマ肺炎とCOVID-19
3. 学会等名 第49回 日本マイコプラズマ学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomohiro Oishi
2. 発表標題 Recent Trend of Pediatric Mycoplasma pneumoniae Infections in Japan.-Focus on Macrolide Resistant Mycoplasma pneumonia
3. 学会等名 The XXIII Congress of the International Organization for Mycoplasma (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石智洋
2. 発表標題 小児マイコプラズマ肺炎の現況
3. 学会等名 日本小児感染症学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石智洋
2. 発表標題 近年、小児より分離された肺炎マイコプラズマにおける治療薬に対する薬剤感受性の検討
3. 学会等名 第69回日本化学療法学会西日本支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石 智洋
2. 発表標題 小児肺炎マイコプラズマ感染症 Mycoplasma pneumoniaeにおける薬剤耐性化の動向とその治療について
3. 学会等名 第52回 日本小児感染症学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大石智洋	4. 発行年 2022年
2. 出版社 近代出版	5. 総ページ数 3
3. 書名 臨床と微生物	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	井上 智貴 (Inoue Tomoki) (50858438)	川崎医科大学・医学部・助教 (35303)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川野 光興 (Kawano Mitsuoki) (00455338)	中村学園大学・私立大学の部局等・准教授 (37109)	
研究分担者	見理 剛 (Kenri Tsuyoshi) (80270643)	国立感染症研究所・細菌第二部・部長 (82603)	
研究分担者	尾内 一信 (Ouchi Kazunobu) (80351899)	川崎医療福祉大学・医療福祉学部・教授 (35309)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関