

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460834

研究課題名(和文) マクロライド耐性マイコプラズマ感染症の流行, 薬剤耐性の把握と臨床的特徴の解明

研究課題名(英文) Investigation of the prevalence of macrolide-resistant mycoplasmal diseases, the susceptibility for antibiotics and the clinical features associated with the resistant bacteria infection.

研究代表者

勝川 千尋 (Katsukawa, Chihiro)

大阪府立公衆衛生研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：20183725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺炎マイコプラズマ感染時、菌の特異遺伝子の検出による確定診断とマクロライド系薬剤の感受性判定を迅速に行うことが症状の軽減、治療期間の短縮につながる事が明らかとなった。2013年～2015年の調査でマクロライド耐性は2015年に耐性率が急激に低下した。原因はマクロライド耐性I型菌からマクロライド感受性II型菌への交代であり、肺炎マイコプラズマは流行菌型の交代に伴い、耐性率の激変がみられることが判明した。

研究成果の概要(英文)：It was found that rapid nucleic acid-based diagnosis for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* and rapid susceptibility testing for macrolides (Decision of the therapeutic antibiotics) led to reduction of the symptom, shortening of the duration of treatment at the time of *M. pneumoniae* infection. The macrolide-resistant mycoplasma suddenly had decreased in 2015 during an investigation period from 2013 through 2015. The major cause was change of prevalence types from macrolide-resistant type I bacteria to macrolide-sensitive type II bacteria. It was recognized that the violent change of the resistance ratio was found with change of the prevalent types.

研究分野：細菌性呼吸器感染症

キーワード：肺炎マイコプラズマ 薬剤感受性 マクロライド系薬剤耐性 遺伝子型別

1. 研究開始当初の背景

(1) マイコプラズマ肺炎は五類感染症であり感染症発生動向調査では定点病院から患者数が報告されその流行が把握できる。全国的には2011年7月以降患者報告数が急増し、2012年にかけて大きな流行が認められていた。感染者の大部分は小児であり、重症者も相対的に増加、公衆衛生上問題となっていた。

(2) マイコプラズマ肺炎の臨床上の問題としてマクロライド系抗生物質が従来のような治療効果が認められず、発熱などの症状が遷延、肺炎に至る症例が増加している傾向にあった。その原因として考えられるマクロライド系薬剤耐性の関与については検査に技術と時間を要することから詳細には調べられてはいなかった。

2. 研究の目的

(1) マイコプラズマ感染症患者から検体を採取、遺伝子工学的手法を用いて診断を行うと同時にマクロライド系薬剤耐性に関与する遺伝子変異の検出も行う。その結果を迅速に還元することにより患者の診断および治療方針の決定に資する情報を提供する。

(2) マイコプラズマ感染症患者の検体から菌分離を行い、マクロライド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、ニューキノロン系抗菌薬に対する経年的な耐性率の変化を、最小発育阻止濃度を測定することにより明らかにする。

(3) 分離菌の型別法を検討、流行菌型、薬剤感受性との関連について検討する。

(4) マイコプラズマ感染症患者において、マクロライド系抗生物質耐性菌感染患者とマクロライド系抗生物質感受性菌感染患者の臨床的特徴を明らかにし、耐性菌による感染と重症度との関連を解明する。

2. 研究の方法

(1) 患者からの検体採取、遺伝子診断、分離培養検査

大阪府内の5カ所の1次医療機関および5カ所の2次医療機関を受診したマイコプラズマ感染疑い患者から咽頭ぬぐい液を、ユニバーサルバイラルトランスポート(日本BD)を用いて採取、保存し、迅速に遺伝子診断と分離培養を行った。遺伝子診断はGENECUBE法とリアルタイムPCR法で実施、分離培養は2層培地とPPL0 brothを用い、8週間培養まで観察した。

(2) 分離菌株の薬剤感受性試験

分離された肺炎マイコプラズマについて、マクロライド系抗生物質(エリスロマイシン、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、ジョサマイシン、ロキタマイシン)、リンコマイシン系抗生物質(クリンダマイシン)、テトラサイクリン系抗生物質(テトラサイクリン、ミノサイクリン)、ニューキノロン系抗菌薬(メチフロキサシン、ガチフロキサシン、レボフロキサシン、シプロフロキサシン)に対する最小発育阻止濃度を微量液体希釈法によって測定した。

(3) マクロライド耐性菌の遺伝子解析

肺炎マイコプラズマのマクロライド耐性は23SリボソームRNA遺伝子ドメインの特定部位(2063番目、2064番目および2617番目)に点変異が生じることにより耐性化することが知られており、特定部位を含む遺伝子を増幅するプライマーをデザイン、PCRで増幅後、ダイレクトシーケンスにより変異の有無を確認した。

(4) 遺伝子型別

肺炎マイコプラズマの遺伝子型別法として従来から用いられてきたP1タンパク質遺伝子のRepMP4領域とRepMP2/3領域の塩基配列の違いによりI型菌とII型菌および各型のサブクラスに型別する方法(PCR-RFLP法)を実施¹⁾、さらにDegrangeら²⁾によってより詳細な型別が行えると報告されたMLVA法についても実施、その有用性を比較しつつ、流行菌型の変遷を検討した。

(5) マクロライド系薬剤感受性と臨床経過との関連性の検討

患者ごとに研究参加の同意を得た後、患者の情報(年齢、性別、有熱期間、有症状期間、症状の重症度、治療薬剤、治療経過)を入手、薬剤感受性試験結果と対比、検討を行った。

3. 研究成果

(1) 検査結果

本研究開始の2013年はマイコプラズマ肺炎の非流行期となり、2013年10月から開始した患者検体採取数は、2013年は21検体、2014年も非流行期が継続し92検体であったが、2015年後半から大阪では患者数の増加が認められ、2015年は281検体を採取した。総計394検体の検査を行い、結果を表1に示した。

表 1

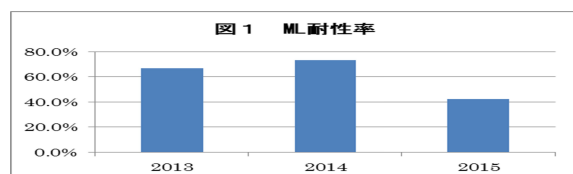
	検体数	陽性検体	陽性検体内訳			陰性検体
			核酸陽性 培養陽性	核酸陰性 培養陽性	核酸陽性 培養陰性	
2013	21	6	5	1	0	17
2014	92	16	15	0	1	74
2015	281	162	151	7	4	119
計	394	184	171	8	5	210

2013年から2014年にかけての非流行期は疑い症例中の陽性率は低かったが、流行期になると陽性率は上昇した。陽性184検体のうち179検体(97.3%)が培養陽性であり、95.7%の遺伝子検査を上回った。遺伝子検査は2013年および2014年はリアルタイムPCRおよびGENECUBEの両方を実施、リアルタイムPCRおよびGENECUBEの肺炎マイコプラズマ特異遺伝子の検出結果は一致した。GENECUBEでは特異遺伝子の検出とともにマクロライド耐性に関する遺伝子変異も検出でき、しかも短時間で結果が得られることから、マクロライド系薬剤耐性菌感染が多い現在、非常に有効な診断法であることが確認できた。

本研究では肺炎マイコプラズマの検査を実施したが、2015年の1検体から *Mycoplasma amphoroforme* を検出した。日本で初めての検出例である。本菌は1999年にWebster³⁾らによって慢性気管支炎を罹患している免疫不全患者から検出され、その後の調査では免疫能の正常な患者からの報告もあり、現在では気道感染症原因菌として認知されている。しかし本菌は栄養要求が厳しくまたその性状が *Mycoplasma pneumoniae* と同様のブドウ糖分解、アルギニン非代謝性であることから、感染していても検出できていないまたは見逃されている可能性も高く、わが国ではこれまで検出の報告はなかった。

(2) 薬剤感受性試験結果

分離した179株の肺炎マイコプラズマについて薬剤感受性試験を実施した結果、81株(45.3%)がマクロライド系抗生物質(エリスロマイシン、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、ジョサ



マイシン、ロキタマイシン)およびリンコマイシン系抗生物質(クリンダマイシン)に耐性を示した。耐性率の経年変化は2013年; 66.7%、2014年; 73.3%、2015年; 41.8%となり、2015年の流行期の流行菌に関しては耐性菌の割合が激減していた。テトラサイクリン系抗生物質(テトラサイクリン、ミノサイクリン)、ニューキノロン系抗菌薬(メチフロキサシン、ガチフロキサシン、レボフロキサシン、シプロフロキサシン)に関しては最小発育阻止濃度の経年変化はなく、耐性化の傾向は認められなかった。

(3) マクロライド耐性菌の遺伝子解析

分離した179株の肺炎マイコプラズマについて、23SリボソームRNA遺伝子ドメインの特定部位(2063番目、2064番目および2617番目)の変異を調べたところ、微量液体希釈法でマクロライド系抗生物質耐性菌と判定した81株はすべて2063番目の塩基がアデニンからグアニンへの変異が認められた。感受性菌についてはすべての株に変異が認められなかった。この結果はGENECUBEで得られた結果とも100%一致した。

(4) 型別法の検討結果

今回の研究では従来から用いられてきたP1遺伝子PCR-RFLP法に加えてMLVA法を導入、型別法について検討した。分離株のうち55株についてP1遺伝子PCR-RFLP法とMLVA法を実施、その結果を表2に示した。

表2

MLVA type	No. of isolates	No. of repeats at the following VNTR loci:					pI typing PCR-RFLP
		Mpn1	Mpn13	Mpn14	Mpn15	Mpn16	
B	1	2	3	5	6	2	IIc1
E	3	2	4	5	7	2	I
G	2	3	3	5	6	2	IIc1
J	11	3	4	5	7	2	I
M	2	4	3	5	6	2	IIc1
P	8	4	4	5	7	2	I
S	1	5	3	5	6	2	IIc1
T	1	5	3	6	6	2	IIb
U	11	5	4	5	7	2	I
X	6	6	4	5	7	2	I
X	1	6	4	5	7	2	I
X	1	6	4	5	7	2	I
Y	1	7	3	5	6	2	IIa
Z	3	7	4	5	7	2	I
NT-1	1	8	4	5	7	2	I
NT-2	1	8	3	5	6	2	IIc1
ND-1	1	ND ^a	4	5	7	2	I
ND-2	1	ND ^b	3	5	6	2	IIc1

NT Untypable by the scheme proposed by Degrange et al.

ND Type not determined

a Repeat 3 and 4

b Repeat 4 and 5

55株を解析した結果、53株が15菌型に分類された。残り2株についてはMpn1の繰り返し数が決定できないため型を決定できなかった。55株のうち3株は連続して感染した事が推測される3兄弟(感染順に患者A、患者C、患者B)から分離された菌株であり、MLVA型は2人(AとC)がJ型、残りの1名(B)がND-1であった。このND-1のMpn1の塩基配列データを詳細に検討したところ、PCR増幅産物に繰り返し数が3と4のものが混在していることが推測された。さらにこの3株をそれぞれクローニングするとMpn1の変異の早さを示唆する結果を得た。すなわち患者Bから分離された菌株は繰り返し数が3の菌株と4の菌株に分かれ、最初の分離株中に繰り返し数が3と4のものが混在していたことが証明された。さらに繰り返し数が3と判定されMLVA型がJ型と判定されていた患者C分離株がクローニングの結果繰り返し数が2と3が混在している株が得られ、その株をさらにクローニ

ングすると繰り返し数が2、3、4のクローンに分離した。

以上の結果から、今回55株の分離菌がMLVA法により15菌型に分類されたがその多くはMpn1の繰り返し数の違いに基づくものであり、Mpn1を除くと3菌型にしか分類できなかった。これはP1遺伝子PCR-RFLP法と変わらない結果となった。Degrangeらの報告²⁾でも263株を26菌型に分類できたと記載されているがMpn1を除くと9菌型にしか分類できていない。その不安定性を証明できたことから本研究では以後の型別についてはP1遺伝子PCR-RFLP法のみで行うこととした。

(5) 型別結果

分離した179株について、P1遺伝子PCR-RFLP法による型別を実施、I型；85株（47.5%）、II型；47株（26.3%）、IIc1型；47株（26.3%）に型別できた。型別不能であった菌株はなかった。

(6) 経年変化とマクロライド耐性との関連

分離菌の型の経年変化とマクロライド系薬剤耐性についてまとめて表3に示した。

表 3

菌株数	型別 & マクロライド感受性					
	I		II		IIc1	
	ML耐性	ML感受性	ML耐性	ML感受性	ML耐性	ML感受性
2013	6	4	0	0	0	2
2014	15	11	0	0	0	4
2015	158	62	7	0	47	38
計	179	77	7	0	47	44

マイコプラズマ肺炎は2015年に再度流行の兆しを見せたが、これまでのマクロライド系薬剤耐性の増加傾向とは異なり、耐性菌は激減した。これは型別の結果からそれ以前に流行していたマクロライド系薬剤耐性I型菌からマクロライド系薬剤感受性II型またはIIc1型へ流行菌がシフトしたことによる結果であることが判明した。過去において肺炎マイコプラズマは数年から10年程度で流行型が変化することが観察されている。その流行菌型の変化時に耐性菌の発生を予防する対策をとることで耐性菌を減少させることができる可能性があることをこれらの結果は示唆している。

(7) マクロライド系薬剤感受性株と耐性株それぞれの臨床経過の比較を行った。その結果、白血球数、CRPに差は認められなかったが、有熱期間は耐性株のほうが長かった。治療に関しては感受性株ではマクロライド系薬剤の投与ですみやかに解熱していたのに対して耐性株では発熱が遷延していた。この耐性株では有効な抗菌薬に変更するタイミングが早いほど有熱期間は短くな

っていた。表4に一次医療機関と二次医療機関に分けた耐性菌検出状況を示した。一次医療機関では感受性菌の割合が高く、二次医療機関では耐性菌の割合が高くなっている。これは一次医療機関ではマクロライド系薬剤で治療する患者が多いのに対して、二次医療機関では一次医療機関で治療に十分反応しなかった患者が二次医療機関に転院、入院といったケースが多いことを示している。

表 4

	菌株数	感受性	耐性	耐性率
一次医療機関	52	42	10	19.2%
二次医療機関	127	56	71	55.9%
計	179	98	81	45.3%

耐性株症例ではマクロライド系薬剤から感受性のあるテトラサイクリン系やニューキノロン系の薬剤に変更後、すみやかに解熱していることが多く、その有効性が示されたが、それぞれの薬剤はその副作用から耐性株に限って使用されることが望ましい。今回の研究で使用したGENECUBE法では遺伝子の検出に加え、マクロライド系薬剤の耐性も同時に迅速に検出できる有用な検査法であることが示された。

引用文献

1. Su CJ, *et al.*, *Infect Immun* 58:2669-2674, 1990.
2. Degrange S, *et al.*, *J Clin Microbiol* 47:914-923, 2009.
3. Webster D, *et al.*, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22:530-534, 2003.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

勝川千尋、水谷香代子、梅田薫、浅井定三郎、荒井和子、園府寺美、梶勝史、櫛引千恵子、塩見正司、武田義廣、中篤子、中野景司、松下享、高橋和郎、肺炎マイコプラズマの遺伝子型別、日本マイコプラズマ学会雑誌、Vol.42、2015、54-56

Kamachi K, Yoshino S, Katsukawa C, Otsuka N, Hiramatsu Y, Shibayama K, Laboratory-based surveillance of pertussis using multitarget real-time PCR in Japan: evidence for *Bordetella pertussis* infection in preteens and teens. *New Microbes New Infect.* 査読有 Vol.8, 2015, 70-74

DOI: 10.1016/j.nmni.2015.10.001

Katsukawa C, Kushibiki C, Nishito A, Nishida R, Kuwabara N, Kawahara R, Otsuka N, Miyaji Y, Toyozumi-Ajisaka H, Kamachi K. Bronchitis caused by *Bordetella holmesii* in a child with asthma misdiagnosed as mycoplasmal infection. *J Infect Chemother*. 査読有 Vol.19, 2013, 534-537
DOI: 10.1007/s10156-012-0482-8

塩見正司 (SHIOMI Masashi)
武田義廣 (TAKEDA Yoshihiro)
中篤子 (NAKA Atsuko)
中野景司 (NAKANO Keiji)
松下享 (MATSUSHITA Tohru)

[学会発表] (計3件)

勝川千尋、水谷香代子、梅田薫、浅井定三郎、荒井和子、囿府寺美、梶勝史、櫛引千恵子、塩見正司、武田義廣、中篤子、中野景司、松下享、高橋和郎、肺炎マイコプラズマの遺伝子型別、日本マイコプラズマ学会第42回学術集会、2015年5月23日、慶應義塾大学薬学部芝共立キャンパス(東京都・港区)

勝川千尋、水谷香代子、高橋和郎、マイコプラズマ感染患者からの菌分離および分離菌の薬剤感受性、第26回日本臨床微生物学会総会、2015年1月31日、京王プラザホテル(東京都・新宿区)

高野智子、田尻仁、高橋和郎、小児のマクロライド耐性マイコプラズマ肺炎の臨床像の検討、第87回日本感染症学会学術講演会、2013年6月5日～6日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝川 千尋 (KATSUKAWA, Chihiro)

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・細菌課・研究員

研究者番号：20183725

(2) 研究分担者

高橋 和郎 (TAKAHASHI, Kazuo)

国際医療福祉大学・大学病院検査部・教授

研究者番号：10171472

(3) 研究協力者

水谷香代子 (MIZUTANI Kayoko)

梅田薫 (UMEDA Kaoru)

浅井定三郎 (ASAI Sadasaburo)

荒井和子 (ARAI Kazuko)

囿府寺美 (KOHDERA Urara)

梶勝史 (KAJI Katsushi)

櫛引千恵子 (KUSHIBIKI Chieko)