

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10046

研究課題名(和文)肺炎マイコプラズマにおける抗菌薬に対する耐性菌の増殖様式と耐性機構の解明

研究課題名(英文)The research for the way of increasing and getting the resistance for antibiotics in Mycoplasma pneumoniae.

研究代表者

大石 智洋(Oishi, Tomohiro)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80612770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：2008年から継続している、日本全国の小児M.pneumoniae (MP)感染症の疫学の検討において、2016年に、小児(MP)感染の再度の流行と共にマクロライド耐性率が再度上昇し、その後再度流行・耐性率とも低下したことを突き止めた。さらに、MPのP1遺伝子解析も行い、近年、P1遺伝子typeが変化しているため、近年増加したP1type2は抗菌薬暴露が少なく、マクロライド耐性MPが誘導されにくいという発想に至った。また、マクロライド系抗菌薬の低濃度でMPを継代培養したところ、一部の株でマクロライド感性MPがマクロライド耐性MPに変化し、マクロライド耐性機構の解明につながると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本国内において、小児M.pneumoniae(MP)感染症由来のMPの菌株をこれほど長期間に多数の保有している施設は他に無く、さらに、臨床情報を常に照合・検討できる環境にもある。さらに、マクロライド以外の抗菌薬に対する薬剤感受性測定やMPに対する培地を作成できる施設は少なく、申請者らの環境は、日本国内では皆無である。日本のようにマクロライド耐性率が流行により短期間で増減している国は他に無く、日本国内で分離されたMPの実験は意義があると考えられる。また、薬剤耐性菌への注意喚起がされている現在、申請者らのデータは、国内外のMP感染症の他、日本国内の薬剤耐性菌対策にも大きなヒントになると考える。

研究成果の概要(英文)：We have conducted the research on epidemiology of pediatric Mycoplasma pneumoniae infection throughout Japan. In our research, the isolation rate of Macrolide resistant M. pneumoniae changed up and down by its pandemic, recently. We also analyzed the Type of P1 protein in M. pneumoniae strains, and found that the dominant type of it changed recently. Specifically the isolation rate of type 2 of P1 protein increased. Type 2 strains might be exposed by antibiotics less than the other type strains, so type 2 strains might be difficult to be induced the resistance to Macrolide. Furthermore, we subcultured Macrolide susceptible M.pneumoniae by low concentration Macrolide antibiotics, and some of them changed to Macrolide resistant ones. This result was thought to connect with the discover the mechanism of getting macrolide resistance in M. pneumoniae

研究分野：感染症

キーワード：マイコプラズマ 小児 薬剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

*M. pneumoniae* 感染症は、かつて4年に1度流行するため、いわゆるオリンピック肺炎とも呼ばれていたが、1990年代になり、クラリスロマイシンやアジスロマイシンなどの新たなマクロライドの出現と共に、日本国内で大きな流行はなかった。しかし、2011-2012年に、しばらくぶりの大きな流行がみられ、同時に2000年前半から出現したマクロライド系薬に耐性を示す *M. pneumoniae*(MRMP)が急激に増加し、ピーク時は80%以上にも達していた。その後、流行の収束と共にMRMPの割合もやや減少傾向にあったが、いつ再び大流行およびMRMPが再度増加するか予測がつかない状況であった。

### 2. 研究の目的

2008年から継続してきた全国調査と共に、今後のMRMPの流行の予測及びその抑制には、なぜマクロライド耐性が起こるのか、そして、他の治療薬については果たして耐性菌が生じるのかについて明確にすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

*M. pneumoniae*の耐性機構解明の手掛かりとして、まず、*M. pneumoniae*における標準株およびマクロライド感受性株とマクロライド耐性株とにおける増殖速度実験につき、*M. pneumoniae*の標準株および臨床分離株、さらに臨床分離株についてはマクロライド耐性遺伝子別に増殖速度実験を行った。

そして、疫学情報として、*M. pneumoniae*の主要な細胞接着タンパク質であるP1を構成する遺伝子(p1遺伝子)のタイピングも、国立感染症研究所の協力の元、従来のRFLP-PCR方により施行した。

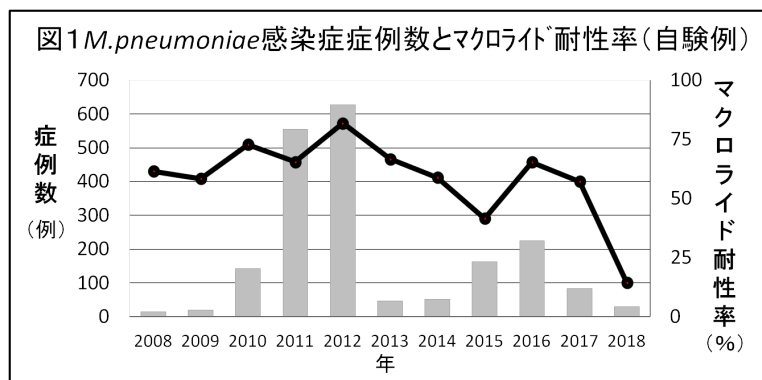
さらに、マクロライド系薬およびそれ以外の治療薬について、薬剤感受性試験と共に、各種抗菌薬添加培地によるマクロライド感受性株の耐性誘導実験(セレクション実験)を施行した。*M. pneumoniae*セレクション実験は具体的に、それぞれのマクロライド感受性 *M. pneumoniae*のCAMとAZMに対するMICと同じ濃度から、10倍ずつ濃度が高くなるように設定し、*M. pneumoniae*の菌株を長期間(1か月間)暴露させる実験を考案した。

### 4. 研究成果

まず、2008年から継続している、日本全国の施設の協力のもと、小児 *M. pneumoniae* 感染症の検体を日本全国から収集し、同時にその医療機関から、使用抗菌薬や臨床経過など、可能な限り、患者さんの臨床情報についての調査(倫理審査番号3119-1)において、その状況を発信し(Tanaka T, Oishi T, . Emerg Infect Dis. 2017) MRMPについて、流行(2011-2012年および2015-2016年)に伴い増加し、非流行期には減少するという、小児 *M. pneumoniae* 感染症流行の増減によりMRMPの増減が急速な変化をすることを突き止めた(図1)。

また、MRMPの耐性機構として、マクロライド系薬の結合部位(ドメインV)領域に生じる点変異であり、この遺伝子変異部位は数種類確認されており、同定されるのはドメインVの2063番目のアデニン(A)のグアニン(G)への変異(A2063G変異)が大半(94.6%)であった。

図1



さらに、マクロライド系薬に対する薬剤最小発育阻止濃度(Minimal Inhibitory Concentration: MIC)も測定し、マクロライド系薬のクラリスロマイシン(CAM)やアジスロマイシン(AZM)に対するMRMPのMICは $>128 \mu\text{g/mL}$ と、マクロライド感受性株のMICに比し大幅に上昇していたが、同じく *M. pneumoniae*に対する治療薬であるキノロン系薬(トスフロキサシン(TFLX))やテトラサイクリン系薬(ミノサイクリン(MINO))については、調査期間中、これらの抗菌薬に対する耐性菌、すなわち他の株に比べ、明らかにMICが高い株は認めなかったことも突き止め、報告した(Oishi T, 2019)。

なお、前述の *M. pneumoniae* (p1遺伝子)のタイピングにおいて、*M. pneumoniae*ではp1遺伝子がtype1とtype2に大きく分かれ、10年ごとにその流行の周期を繰り返していると報告さ

れているが(keinri T,2002)、我々の調査で、2011-2012年まではほとんど type1であったが、2015-2016年の再流行時以降は type2が増加し、かつ type2はマクロライド耐性率が低いことが判明した。

このような結果を踏まえ、我々は、以下の事を予測した。

マクロライド系薬耐性 *M.pneumoniae* のうち A2063G 変異株は他の変異株より増殖しやすいこと

*M.pneumoniae* では遺伝子タイプ (p1type) によりマクロライド系薬に対する耐性誘導が違ふこと

*M.pneumoniae* におけるキノロン系薬やテトラサイクリン系薬に対する耐性遺伝子保有株の存在

既に前述のセレクション実験の予備実験は終了しているため、今後の研究において、セレクション実験の手法を用い、上記の点につき解明していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Oishi T, Takahashi K, Wakabayashi S, Nakamura Y, Ono S, Kono M, Kato A, Saito A, Kondo E, Tanaka Y, Teranishi H, Akaike, Tanaka T, Miyata I, Ogita S, Ohno N, Nakano T, Ouchi K	4. 巻 63
2. 論文標題 Comparing Antimicrobial Susceptibilities among Mycoplasma pneumoniae Isolated from Pediatric Patients in Japan between Two Recent Epidemic Periods.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 2517～2518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AAC.02517-18	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 Tanaka Takaaki, Oishi Tomohiro, Miyata Ippei, Wakabayashi Shoko, Kono Mina, Ono Sahoko, Kato Atsushi, Fukuda Yoko, Saito Aki, Kondo Eisuke, Teranishi Hideto, Tanaka Yuhei, Wakabayashi Tokio, Akaike Hiroto, Ogita Satoko, Ohno Naoki, Nakano Takashi, Terada Kihei, Ouchi Kazunobu	4. 巻 23
2. 論文標題 Macrolide-Resistant Mycoplasma pneumoniae Infection, Japan, 2008-2015	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1703～1706
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3201/eid2310.170106	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17件（うち招待講演 6件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tomohiro Oishi, Yuhei Tanaka, Takaaki Tanaka, Ippei Miyata, Kazunobu Ouchi
2. 発表標題 THE EPIDEMICAL FEATURES OF MYCOPLASMA PNEUMONIA INFECTION AMONG CHILDREN THROUGHOUT JAPAN IN THE RECENT 10 YEARS
3. 学会等名 the asian congress of pediatric infectious diseases（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomohiro Oishi, Yuhei Tanaka, Takaaki Tanaka, Ippei Miyata, Kazunobu Ouchi
2. 発表標題 Clinical aspects of Mycoplasma pneumoniae pneumonia The epidemical features of Mycoplasma pneumoniae infection among children throughout Japan in recent 10 years
3. 学会等名 The 7th Meeting of the Asian Organization for Mycoplasmaology（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	Kazunobu Ouchi, Shintaro Goto, Yoko Fukuda, Tomohiro Oishi, Ippei Miyata, Shoko Wakabayashi, Mina Kono, Sahoko Ono, Aki Saito, Atsushi Kato, Eisuke Kondo, Yuhei Tanaka, Hideto Teranishi, Hiroto Akaike, Takaaki Tanaka, Satoko Ogita, Naoki Ohno, Takashi Nakano
2. 発表標題	Nationwide survey of Mycoplasma pneumoniae infections and Chlamydia pneumoniae infections in children in Japan 2008-2017
3. 学会等名	Pediatric Academic Societies Meeting (国際学会)
4. 発表年	2018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の現況 ～診断と治療を中心に～
3. 学会等名	第93回日本感染症学会総会・学術講演会 (招待講演)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	中村祥崇, 大石智洋, 高橋研斗, 若林尚子, 小野佐保子, 河野美奈, 加藤敦, 近藤英輔, 田中悠平, 寺西英人, 赤池洋人, 田中孝明, 宮田一平, 大野直幹, 中野貴司, 尾内一信
2. 発表標題	日本全国における小児マイコプラズマ感染症の近年の動向
3. 学会等名	第50回日本小児感染症学会総会・学術集会
4. 発表年	2018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の近況
3. 学会等名	第29回日本小児科医会総会フォーラム (招待講演)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 田中悠平, 大石智洋, 若林尚子, 小野佐保子, 河野美奈, 加藤敦, 齋藤亜紀, 近藤英輔, 寺西英人, 赤池洋人, 田中孝明, 宮田一平, 荻田聡子, 大野直幹, 升野光雄, 松田純子, 中野貴司, 寺田喜平, 尾内一信
2. 発表標題 日本全国における小児マイコプラズマ感染症の動向
3. 学会等名 第121回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石智洋, 宮田一平, 田中孝明, 田中悠平, 小野佐保子, 河野美奈, 福田陽子, 齋藤亜紀, 近藤英輔, 加藤敦, 寺西英人, 中野貴司, 寺田喜平, 尾内一信
2. 発表標題 2016年に、日本全国の小児マイコプラズマ感染症罹患児より分離されたMycoplasma pneumoniaeの検討
3. 学会等名 日本マイコプラズマ学会 第44回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中悠平, 大石智洋, 長谷川俊史, 小野佐保子, 河野美奈, 福田陽子, 加藤敦, 齋藤亜紀, 田中孝明, 宮田一平, 大野直幹, 中野貴司, 寺田喜平, 尾内一信
2. 発表標題 ステロイド投与後に再燃を来したマイコプラズマ肺炎の検討
3. 学会等名 第49回日本小児感染症学会 総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大石智洋
2. 発表標題 肺炎における非定型病原体の役割を再考する 小児でのニューキノロン、テトラサイクリンならびにステロイド使用について<Pros側>
3. 学会等名 第91回日本感染症学会総会・学術講演会、第65回日本化学療法学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大石智洋
2. 発表標題 ヒトの臨床におけるマイコプラズマ感染症の多様性と課題 小児科医の立場からみたマイコプラズマ感染症の多様性と課題
3. 学会等名 第44回日本マイコプラズマ学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大石智洋、田中孝明1、赤池洋人、宮田一平、尾内一信
2. 発表標題 小児マイコプラズマ (Mycoplasma pneumoniae) 感染症における薬剤感受性試験と臨床経過からみた治療薬の検討 (多施設共同研究)
3. 学会等名 第64回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大石智洋
2. 発表標題 小児科医の立場からみたマイコプラズマ感染症の多様性と課題
3. 学会等名 日本マイコプラズマ学会第43回学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大石智洋
2. 発表標題 小児マイコプラズマ感染症に関する最近の話題
3. 学会等名 第26回 日本外来小児科学会学術集会年次集会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大石智洋
2. 発表標題 小児マイコプラズマ感染症における現況について
3. 学会等名 第48回 日本小児感染症学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2016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診断と治療
3. 学会等名 第48回 日本小児感染症学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tomohiro Oishi
2. 発表標題 Epidemiological And Clinical Investigation Of Mycoplasma pneumonia Infection In Children Throughout Japan Between 2008 And 2014
3. 学会等名 21st Congress of the International Organization for Mycoplasmology
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔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	宮田 一平  (Miyata Ippei)  (20600969)	川崎医科大学・医学部・講師    (35303)	



## 6. 研究組織（つづき）

	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	赤池 洋人 (Akaike Hiroto) (40454813)	川崎医科大学・医学部・講師  (35303)	
研究分担者	田中 孝明 (Tanaka Takaaki) (40598091)	川崎医科大学・医学部・講師  (35303)	
研究分担者	尾内 一信 (Ouchi Kazunobu) (80351899)	川崎医科大学・医学部・教授  (35303)	
研究分担者	田中 悠平 (Tanaka Yuhei) (70446102)	川崎医科大学・医学部・助教  (35303)	