

の喀痰から DNA を抽出し、nested PCR 法によって *M pneumoniae* の P1 遺伝子を検出した。検出用のプライマー対は、1 段階目に ADH-2F/ADH-2R、2 段階目には ADH-3F/ADH-3R を使用した (表 1)。P1 遺伝子が検出された喀痰検体は、PCR 産物を鋳型として、型別用のプライマー対 (ADH-4F/N1/2N2C) (表 1) を使用した PCR によって P1 遺伝子の型を特定した。

### C 研究結果

2000 年から 2003 年までの *M pneumoniae* 分離菌 50 株を PCR-RFLP 法で分析すると、26 株が I 型に、18 株が II 型に、6 株が II' 型に分類された。分離年ごとに見ると、2000 年は分離菌 2 株とも II 型菌、2001 年は分離菌 7 株中、6 株が II 型、1 株が II' 型菌だった。2002 年は分離菌 5 株中 2 株が I 型菌、3 株が II 型菌、さらに 2003 年は分離菌 36 株中、24 株が I 型菌、7 株が II 型菌、5 株が II' 菌だった。2000 年と 2001 年には I 型菌が 1 株も分離されていないが、2003 年には I 型菌が多数を占めるようになってきていることが明らかになった (表 2)。一方、呼吸器疾患患者由来の喀痰から DNA を抽出して、PCR 法で *M pneumoniae* の P1 遺伝子の検出をおこなうと、925 検体のうち 91 検体 (9.8%) について P1 遺伝子が検出された。さらに、この P1 遺伝子の型別をおこなうと、91 検体のうち 83 検体 (9.1%) の型別が可能であった。型別結果のうちわけは、I 型が 40 例、II

型が 41 例、I 型と II 型の両方が検出されたものが 2 例だった (表 3)。I 型と II 型の両方が検出された 2 例の検体については、患者が 2 つの型の *M pneumoniae* に同時に感染していたことも考えられるが、PCR 検出における偽反応である可能性も考えられる。年度ごとに見ると 2000 年の検体では I 型が 0 例、II 型が 9 例、I 型と II 型の両検出が 1 例、2001 年は I 型が 14 例、II 型が 13 例だった。2002 年は I 型が 24 例、II 型が 19 例、両検出が 1 例、2003 年は I 型が 2 例、II 型が 0 例だった (表 3)。喀痰からの *M pneumoniae* 検出型別の結果も、2000 年には II 型菌が優位で I 型菌がほとんど出現していないのに対し、2001 年以降は I 型菌が出現し、現在は多数を占めるようになってきていることがわかった。

### D 考察

本研究では、日本における *M pneumoniae* の菌型が、2001 年から 2003 年の間に、II 型から I 型へ交代していたことが明らかになった。我々はこれまでも *M pneumoniae* 分離菌の型別調査をおこなってきたが、本研究では、分離菌だけでなく、患者喀痰中に存在する *M pneumoniae* についても、新たにデザインした nested PCR 法によって検出、型別をおこなっている。この検討によって、従来より多くの *M pneumoniae* の型が調査されており、II 型から I 型へ菌型が交代したことが正確にとらえられて

いると考えている。今回得られた結果と、これまでに得られていた結果を合わせると、**図 1**、**図 2** のようになる。**図 1**、**2** の年次推移データは明らかに、臨床に出現する *M pneumoniae* の型が、8年から10年程度の周期で入れ代わっていることを示している。このデータにおいて分析した菌株が日本各地から収集されていることを考えると、この現象は局地的なものではなく全国的に見られるものと思われる。また、最近海外でも類似した疫学データの報告がみられる。このような菌株型の交代現象かどういった要因で起こるのかは、現時点では正確にはわからない。しかし、*M pneumoniae* とヒトの免疫との相互作用によって起きている可能性が高いと考えられる。*M pneumoniae* に感染した場合に生じるヒトの免疫は数年程度持続するとされているか、I型菌が感染した場合とII型菌が感染した場合は防御免疫に微妙な差があり、同じ型の菌にはより再感染しにくいといった状況が生じることなどが予想される。現在日本では、マイコプラズマ肺炎の周期的な流行が見られなくなっているか、過去には4年ごとに大流行が起きていた。過去の4年周期の大流行は、*M pneumoniae* の菌の型が入れ代わる時期と、どちらかの菌型が完全に優位に存在する時期に起きている(**図 1**)。*M pneumoniae* にI型とII型菌が存在し、ヒトの免疫と相互作用したことが過去に大流行が起きた

原因となっていた可能性も考えられる。本研究結果からは、2001年から2003年の間にII型からI型への交代が起こったことか明らかにされたか、この時期のマイコプラズマ肺炎の発生状況を見ると、2001年以降、大流行ではないかマイコプラズマ肺炎の発生数は増加傾向にある(**図 3**)。マイコプラズマ肺炎の増加とI型菌が広まってきたことの関連が疑われる。また、2003年の分離菌ではII型の亜種であるII'型菌が5株と比較的多く出現している。今後は、II'型菌の出現動向も注意する必要がある。I型菌とII型菌では*M pneumoniae* の病原性に必須なP1接着タンパク質にアミノ酸配列に違いが生じている。また、P1タンパク質以外にもいくつかの遺伝子に違いが見つかっている。しかし、I型菌とII型菌の、病原性の強弱などはわかっておらず、今後の検討課題である。

## E 結論

マイコプラズマ肺炎の原因菌 *M pneumoniae* は、近年はII型菌が多くを占めてきたが、2002年頃からI型菌が主流に転じている。日本では2001年以降マイコプラズマ肺炎の発生数が増加しており、I型菌の出現との関連が疑われる。今後も調査を継続する必要がある。

## F 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1 論文発表

見理 剛 マイコプラズマの遺伝子学 日本臨牀増刊号, 61 772-778, 2003

Horino A , Sasaki Y, Sasaki T, Kenri T  
Multiple promoter inversions generate surface antigenic variation in *Mycoplasma penetrans* J Bacteriol 2003, 185(1) 231-42

### 2 学会発表

佐々木裕子、堀野敦子、見理 剛、佐々木次雄 *Mycoplasma penetrans* ケノムにおける未知病原遺伝子の探索、第 76 回日本細菌学会、平成 15 年 4 月

見理 剛、他 6 名 YFP 蛍光タンパク質を用いた *M pneumoniae* の接着器官の視覚化、第 76 回日本細菌学会、平成 15 年 4 月

見理 剛、堀野敦子、佐々木裕子、佐々木次雄 蛍光タンパク質を用いた *Mycoplasma pneumoniae* の細胞構造の観察、第 30 回日本マイコプラズマ学会、平成 15 年 10 月

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

表 1. PCR 用プライマー

---

ADH1	CTGCCTTGTCCTCAAGTCCACT
ADH2	AACCTTGTCGGGAAGAGCTG
ADH3	CGAGTTTGCTGCTAACGAGT
ADH4	CTTGACTGATACCTGTGCGG
ADH-2F	GGCAGTGGCAGTCAACAAACCACGTAT
ADH-2R	GAACCTTAGCGCCAGCAACTGCCAT
ADH-3F	GAACCGAAGCGGCTTTGACCGCAT
ADH-3R	GTTGACCATGCCTGAGAACAGTAA
ADH-4F	GACCGCATCAACCACCTTTGCGTTACG
N1	CCCGGTGGTGGAAAGTATTTT
2N2C	TGCCTTGGTCACCGGAGTTG

---

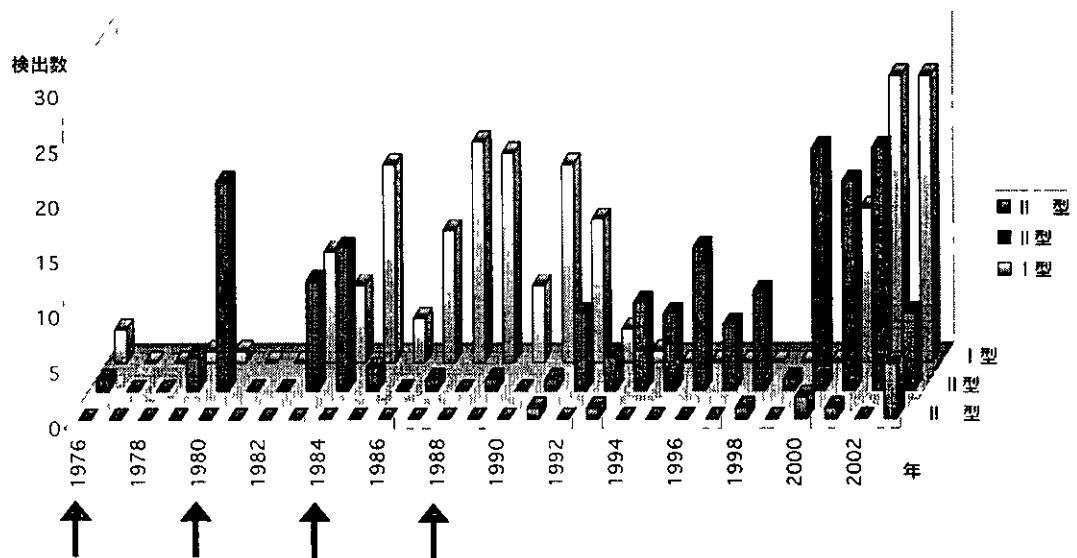
表 2. *M pneumoniae* 分離菌型別結果

年度	分離菌数	I 型	II 型	II' 型
2000	2	0	2	0
2001	7	0	6	1
2002	5	2	3	0
2003	36	24	7	5
計	50	26	18	6

表 3. 喀痰からの *M pneumoniae* 検出型別結果

年度	I 型	II 型	I+II 型	計
2000	0	9	1	10
2001	14	13	0	27
2002	24	19	1	44
2003	2	0	0	2
計	40	41	2	83

図 1. *M pneumoniae* 臨床株型の年次推移



(矢印は、日本でマイコプラズマ肺炎の大流行が見られた年)

図 2. *M. pneumoniae* 臨床株型の年次推移 (各菌型の分離の比)

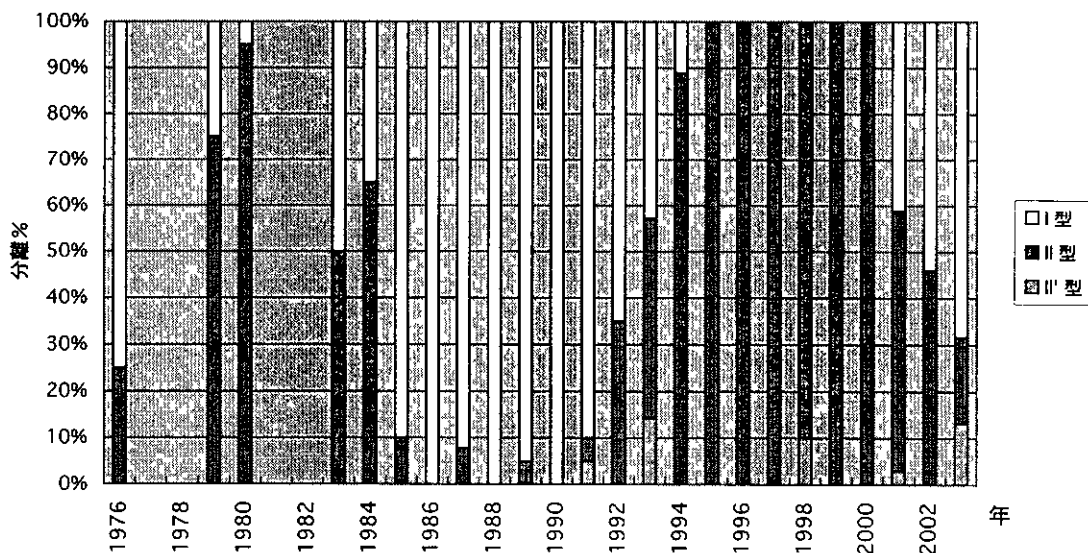
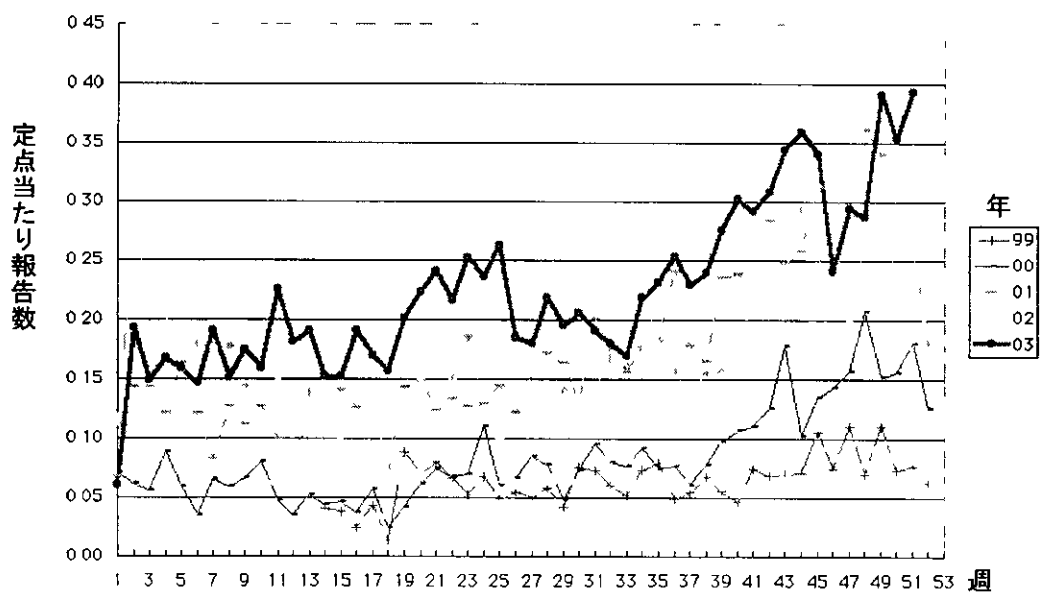


図 3. マイコプラズマ肺炎の発生状況



国立感染症研究所 感染症情報センターの定点観測による

厚生労働科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

マクロライド耐性マイコプラズマ野生株の性状解析と、その臨床医学に関わる問題点

分担研究者 成田光生 札幌鉄道病院・小児科

研究協力者 岡崎則男，大屋日登美，神奈川県衛生研究所・呼吸器系細菌，  
久保田貞由美，国立感染症研究所・細菌第二部第二室）

**研究要旨** 札幌市，北海道池田町，茅ヶ崎市などにおいてマイコプラズマ肺炎の流行が有り，その肺炎患者より肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) の野生株を分離・収集し，性状解析を行った。その結果，平成12年から15年までの分離状況においては総分離株数76株のうち13株（17.1%）について，マクロライド剤に対する薬剤耐性（最小発育阻止濃度の上昇）が認められた。さらに23SリボソームRNAトメインVの遺伝子変異を検索した結果，その内訳は，A2063Gが10株，A2063C，A2064G，C2617Gが各1株であった（変異部位と塩基置換を示す。2063，2064，2617はそれぞれ大腸菌における2058，2059，2611に相当する）。マクロライド耐性肺炎マイコプラズマは普遍的に野生に存在しており，今後その蔓延による臨床への影響が危惧される。

**A 研究目的**

近年，臨床的印象から薬剤耐性が疑われた肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*，以下，単にマイコプラズマと略す) による肺炎の発生が全国各地から報告されている。一方で種々の呼吸器疾患に対するマクロライド少量持続投与療法の有効性が確立されており，その関連が危惧されている。このような状況において，野生では実際にどの程度の頻度でマクロライド耐性マイコプラズマが出現しているのかを把握し，その薬剤耐性機序を検討することは重要な問題と考えられる。本研究においては，マイコプラズマ肺炎患者よりマイコプラズマ野生株の分離を行ない，その性状を解析することを目的とする。

**B 研究方法**

マイコプラズマ野生株の分離は，通常の滅菌綿棒にて患者の咽頭あるいは扁桃粘膜を擦過し，自家製のPPL0培地を用いて行なった。

マイコプラズマの薬剤感受性試験は，微量液体培地希釈法（マイクロプレート法）を用いて行なった。すなわち，PPL0培地で2ないしは4倍階段希釈した薬剤希釈液100 $\mu$ lを96入マイクロプレートに分注し，さらにマイコプラズマ希釈液（約10<sup>4</sup>CFU/ml）100 $\mu$ lを各ウェルに分注する。対照として，薬剤を含まない培地200 $\mu$ lのウェル（培地対照），および薬剤を含まない培地100 $\mu$ lにマイコプラズマ希釈液100 $\mu$ lを分注したウェル（マイコプラズマ対照）を用意する。マイクロプレートをミキサーで十分混

釈し、乾燥を防ぐために湿潤箱に入れ、37°Cで好気培養する。マイクロプレートを毎日2回（朝と晩）観察し、マイコプラズマ対照ウェルが完全に黄変した時に、培地対照ウェルと変わらない色調（橙赤色）を呈するウェルの薬剤濃度を最小発育阻止濃度（MIC,  $\mu\text{g/ml}$ ）とした。試験薬剤としては、14員環マクロライドとしてエリスロマイシン、クラリスロマイシン、ロキンスロマイシン、オレアノトマイシン、15員環マクロライドとしてアンソロマイシン、16員環マクロライドとしてシヨサマイシン、ロキタマイシン、スピラマイシン、ミテカマイシン、キタサマイシン、テトラサイクリン系としてテトラサイクリンとミノサイクリン、リンコサミト系としてリンコマイシン、ニューキノロン系の合成抗菌剤としてノフロキサノン、パスフロキサノン、レホフロキサノン、トスフロキサノン、ノプロフロキサノン、スパルフロキサノン、ガチフロキサシンを用いた。

現在までマイコプラズマの実験室株に

おいて、マクロライドに対する薬剤耐性機構として知られている23S rRNA トメインVにおける遺伝子変異の検索については、PCR-直接塩基配列決定法を用いて行なった。すなわち、分離株のうち単一コロニーを純培養にて増菌し、熱処理によりDNAを抽出した。はじめにトメインVの広い領域を増幅し、次に2063と2064番目のアテンンを含む領域および2617番目のノトンンを含む領域をそれぞれ増幅したのち、塩基配列を決定した。PCRに用いたプライマーおよび増幅領域を表1に示した。反応条件は、広域のプライマーにより94°C45秒、55°C60秒、72°C80秒の反応を30サイクル、その後2063、2064領域あるいは2617領域それぞれのプライマーにより94°C45秒、55°C60秒、72°C60秒の反応を30サイクル行なった。

表1 23S rRNA トメインV 塩基配列決定に使用したプライマー

名称	塩基配列(5' -3')	位置	断片長
トメインV(広域)			
MH23S F1758	GCAGT GAAGA ACGAG GGG	1758-1775	927 bp
MH23S R2664	GTCCT CGCTT CGGTC CTCTC G	2664-2684	
2063, 2064 領域			
MN23S F1918	ACTAT AACGG TCCTA AGGTA	1918-1937	210 bp
MN23S R2108	ACCTA TTCTC TACAT GATAA	2108-2177	
2617 領域			
MN23S F2577	TACGT GAGTT GGGTT CAAA	2577-2595	108 bp
MN23S R2664	GTCCT CGCTT CGGTC CTCTC G	2664-2684	

塩基配列および位置は、DDBJ/EMBL/GenBank テータベース登録番号 X68422 による

またマクロライドに対する薬剤耐性機構としては23S rRNA トメインV

の変異の他にもいくつかの耐性機構が知られており、このうち今回検索し

た 23S r RNA トメイン II およびリボソーム蛋白 L4, L22 の塩基配列の決定に用いたプライマーおよび増幅領域を

表 2 23S r RNA トメイン II およびリボソーム蛋白 L4, L22 の塩基配列決定に使用したプライマー

名称	塩基配列 (5' -3' )	位置	断片長
トメイン II 23S D2F 23S D2R	AGTAC CGTGA GGGAA AGGTG TCCCA AGCGT TACTC ATGCC	491-510 1287-1306	816bp
リボソーム蛋白 L4 L4F L4R	AAAAG CAGCA CCACT TGTAG GGTTA GAACT GGTTT TAGCA	1231-1250 1933-1952	722 bp
リボソーム蛋白 L22 L22F L22R	GTACA TAACG GCAAG ACCTT GCAAG CCGTT GGAGT TTAAT	3640-3659 4247-4266	627 bp

配列および位置は、トメイン II はマイコプラズマ塩基配列登録番号 X68422, リボソーム蛋白 L4, L22 はマイコプラズマ M129 登録番号 AE000061 による

### C 研究結果

薬剤感受性試験の結果、平成 12 年から 15 年まで分離の野生株においては、札幌では 15 株中 2 株 (13.3%), 北海道他田町では 11 株中 2 株 (18.2%), 高知県では 6 株中 2 株 (33.3%), 神奈川県では茅ヶ崎市を中心に 44 株中 7 株 (15.9%), 総分離株数にすると 76 株のうち 13 株 (17.1%) について、マクロライド剤に対する明らかな MIC の上昇が認められた (表 3) この点、1983-98 年の間に神奈川県衛生研究所にて分離された野生株 296 株のうちには耐性菌は 1 株も存在していなかった 23S r RNA トメイン V における遺伝子配列検索の結果、2063 番目のアデニンがクアニンに置換したもの (A2063G と表記、以下同様) が 10 株、A2063C, A2064G, C2617G が各 1 株であった (2063, 2064, 2617 はそれぞれ大腸菌

における 2058, 2059, 2611 に相当)

遺伝子変異の種類から薬剤感受性試験の結果を見ると、A2063G の変異 (10 株) では 14, 15 員環マクロライドに対しては一律に高度耐性 (検索したいすれの薬剤に対しても MIC が最低希釈濃度以上) であったか、16 員環マクロライドにおける結果は薬剤により、あるいは株によりはらつきが有り、一定の傾向が認められなかった (表 4) とりわけロキタマイシンについてははらつきが大きく、中には感受性とも考えられる株が存在した (表 5) A2063C 及び A2064G の変異 (各 1 株) では 14 から 16 員環全てのマクロライドに高度耐性 (検索したいすれの薬剤に対しても MIC が最低希釈濃度以上) であった C2617G では 14, 15 員環マクロライドでは薬剤により MIC は大きなはらつきが見られ、16 員環マクロラ



イトにはMICのわずかな上昇は認められるものの概ね感受性、という結果であった

L4, L22 の塩基配列に関しては、今回検索した範囲では、薬剤耐性に関わる遺伝子変異は見出されなかった

トメインⅡおよびリホソーム蛋白

表3 平成15年までに分離された薬剤耐性マイコプラズマ野生株

遺伝子変異	株数	母数	頻度	地域または施設(年)
A2063G	2	15	13%	札幌(2000, 2002)
	2	6	33%	高知県衛研(2001)
	6	44	14%	神奈川県衛研(2003)
A2063C	1	11	9%	北海道他田町(2002)
A2064G	1	44	2%	神奈川県衛研(2003)
C2617G	1	11	9%	北海道他田町(2002)

マイコプラズマにおける 23S rRNA トメインV の変異部位と塩基置換 2063, 2064, 2617 は大腸菌における 2058, 2059, 2611 に相当

表4 薬剤耐性マイコプラズマ野生株の遺伝子変異と薬剤感受性\*1

薬剤*2	A2063G*3 (n=10)	A2063C (n=1)	A2064G (n=1)	C2617G (n=1)	感受性株 (標準株 M129)
EM(14)	>12.5	>12.5	>12.5	3.125	0.012
CAM(14)	>12.5	>12.5	>12.5	0.78	0.012
RXM(14)	>12.5	>12.5	>12.5	12.5	0.012
OL(14)	>12.5	>12.5	>12.5	>12.5	0.098
AZM(15)	>12.5	>12.5	>12.5	0.012	0.002
JM(16)	6.25→12.5	>12.5	>12.5	0.049	0.098
RKM(16)	0.195-1.563	6.125	>12.5	0.195	0.049
SPM(16)	6.25→12.5	>12.5	>12.5	0.78	0.098
MDM(16)	6.25→12.5	>12.5	>12.5	0.195	0.049
KTM(16)	6.25→12.5	>12.5	>12.5	0.195	0.049
LCM	>12.5	>12.5	>12.5	12.5	6.25
TC	0.39	0.39	0.78	0.78	0.78
MINO	0.098	0.098	0.78	0.39	0.78

\*1, 数字はMIC, 最小発育阻止濃度(μg/ml)

\*2, EM, エリスロマイシン, CAM, クラリスロマイシン, RXM, ロキンスロマイシン, OL, オレアノトマイシン, AZM, アンソロマイシン, JM, ショサマイシン, RKM, ロキタマイシン, SPM, スピラマイシン, MDM, ミテカマイシン, KTM, キタサマイシン, LCM, リンコマイシン, TC, テトラサイクリン, MINO, ミノサイクリン ( ) 内は員環数

\*3, マイコプラズマにおける 23S rRNA トメインV の変異部位と塩基置換 2063, 2064, 2617 は大腸菌における 2058, 2059, 2611 に相当

表5 A2063G 変異マイコプラズマ野生株のロキタマイシンに対する感受性

株番号	MIC (μg/ml)
C-1	0 195
N-12, T-1, T-6, T-22, T-67	0 781
T-12	1 563
M129 (標準株)	0 049

また上述のマクロライド耐性菌はマクロライド以外の薬剤では、感受性株のMIC値との比較で判断すると、テトラサイクリンとミノサイクリンには感受性、リンコマイシンには耐性、ニューキノロン系の合成抗菌剤のう

ちレホフロキサシン、トスフロキサシン、シプロフロキサシン、スパルフロキサシン、ガチフロキサシンには感受性、と考えられる結果であった(表4, 6)

表6 薬剤耐性マイコプラズマの合成抗菌剤に対する感受性\*1

変異*2	NLFX	PZFX	LVFX	TFLX	CPFX	SPFX	GFLX
A2063G	6 25	6 25	0 39	0 39	0 78	0 098	0 098
A2063C	6 25	12 5	0 39	0 39	1 56	0 098	0 098
感受性株*3 (n=10)	3 13- 12 5	6 25- 12 5	0 39- 0 78	0 049- 0 098	0 195- 0 78	0 049- 0 098	0 049- 0 098

\*1, 数字はMIC, 最小発育阻止濃度(μg/ml) NLFX, ノルフロキサシン, PZFX, パスフロキサシン, LVFX, レホフロキサシン, TFLX, トスフロキサシン, CPFX, シプロフロキサシン, SPFX, スパルフロキサシン, GFLX, ガチフロキサシン

\*2, 23S rRNA トメインVにおける変異部位と塩基置換

\*3, 他田町(北海道)由来6株, 神奈川県由来4株の野生株

#### D 考察

マクロライド耐性マイコプラズマは札幌市, 北海道他田町, 茅ヶ崎市, 高知県など日本各地から分離されており, 本研究結果は現在の日本におけるして実状を反映していると考えられる。平成12年から15年まで分離の野生株において総分離株数76株のうち13株(17.1%)についてマクロライド剤に対する薬剤耐性が認められたことは,

薬剤耐性マイコプラズマは決して稀なものではなく, 普遍的に野生に存在していることを示唆している。そして1998年以前(99年は分離株無し)には296株中1株も耐性株は分離されていなかったことから, この耐性化は2000年以後急速に進展したことか推測される。この理由は不明である。

蛋白はリボソームで合成される。このリボソームは50Sサブユニットと

30Sサブユニットに分かれており、それぞれがrRNAと20種類以上の蛋白から構成されている。50Sサブユニットの中でアミノ酸がつなかれポリペプチドが合成されていくか、この際重要な働きをするのか、23S rRNAである。その中心がトメインVで、マクロライトはこのトメインVに結合することによりその機能を阻害し、蛋白の合成を抑制する。このマクロライトがトメインVに結合するうえで重要な部位が2063番目と2064番目のアデニン（大腸菌では2058番目と2059番目に相当）であり、これらの部位に置換やメチル化の変異が生ずるとマクロライトはトメインVに結合できず、即ち蛋白合成を阻害できず、その菌は完全に耐性化する。またトメインVはループ状の構造をとっているか、このループを閉じる役割をしているのか、2062番目のクアニンと2617番目のシトシン（大腸菌では2057番目と2611番目に相当）の塩基結合である。これらの塩基のいずれかに変異が生じて結合が外れるとこのループが緩み、即ちマクロライトがトメインVから外れやすくなり、その菌は不完全に耐性化すると考えられる。また野生株においてA2063Gが圧倒的に多い理由としては、A2063Gが最も効果的に耐性を誘導し、かつ菌自体の生育に負担をかけない、すなわち変異株としては野生で最も増殖力が強く、伝播し易いことが推測される。

マクロライト耐性マイコプラズマの発生メカニズムとしては、抗生剤の

pressureによるselectionの結果と考えるのか自然である。現在まで、実験的にはエリスロマイシンの少量添加培養により同様のpoint mutationによる耐性株が得られること、また臨床的には薬剤治療が成功したかに見える肺炎患者からもマイコプラズマが分離し得ることか知られている。抗生剤により治療され臨床的には治癒した患者の中で実際には耐性菌が出現しており、周囲に排せされ、感染を起こした可能性が高いと考えられる。一方で現在のところ、マイコプラズマの薬剤耐性機構として野生株で実際にその存在が証明されているのは、上述のことく23S rRNAトメインVのpoint mutationのみである。他の病原細菌で明らかにされているメチル化遺伝子や薬剤排出ポンプの存在は見つかっていない。したがって耐性機構がこのpoint mutationに限られているうちは、この耐性機構が別の感受性マイコプラズマに伝播されることは無く、またマクロライトの少量持続投与療法により一般細菌あるいは常在菌に耐性が発現し、そこからマイコプラズマに耐性機構が伝播する可能性は無いものと考えられる。

なおA2063G変異野生株についてロキタマイシンのMICが株によりはらついた現象は、ロキタマイシンの耐性機構がトメインVにおける点突然変異以外に存在している可能性も示唆しており、今後の検討課題のひとつである。またC2617Gの変異における14員環マクロライトのMICのはらつきの理由に

についても、現在のところ不明である

臨床に関わる問題としてマクロライド耐性マイコプラズマ感染症の診断については、臨床症状からは耐性菌感染は判別できない。またマイコプラズマは増殖に週単位を要するため、培養法ではそれか分離された患者の治療には間に合わない。培養法に代わるものとして、咽頭擦過物を検体とし、前述のプライマーを用いたPCR法による迅速診断の可能性に付き、現在検討中である。

最後に現時点におけるマイコプラズマ肺炎治療の基本方針をまとめる。現在、耐性菌が過半数を占めた流行は観察されておらず、耐性菌感染による肺炎が必ずしも重症化するという傾向も認められていないことから、やはり第1選択はマクロライド系薬剤が基本であると考えられる。また耐性菌感染による肺炎であっても最終的には自然治癒したか、あるいは発熱から

4-5日経過した例では臨床的にはマクロライド系薬剤が奏功した印象が持たれる場合がある。この点に関しては、次年度以後、症例数を増やしての検討課題と考えられる。一方、肺炎の重症例、あるいは耐性菌が肺外発症を起こした場合には、耐性菌に対し抗菌力が確定している薬剤の投与が必要と考えられる。この際選択の対象となる薬剤を表7にまとめた。耐性菌の感受性、疾患としての保険適応などについて成人では問題無いか、実際に患者数の多い小児に対する適応を厳密に考慮すると、小児においてはミノサイクリンしか無い。この点は問題であり、症例の年齢、重症度などによっては注射剤と散剤の有るシプロフロキサシン、散剤の有るレホフロキサシンなども視野に入れて選択しなければならない場合も出てくるものと考えられる。

表7 マクロライド耐性マイコプラズマ感染症治療薬の選択

薬 剤	耐性株感受性	マイコプラズマに対する適応(「肺炎」での適応)	小児適応	剤 型		
				錠	散	注射
ミノサイクリン	有り	無し(有り)	有り	○	○	○
シプロフロキサシン	有り	無し(有り)	無し	○	○	○
カチフロキサシン、 スパルフロキサシン	有り	有り	無し	○	×	×
レホフロキサシン	有り	無し(有り)	無し	○	○	×
トスフロキサシン	有り	無し(有り)	無し	○	×	×

「適応」は保険適応を意味する

## E 結論

マイコプラズマ自体には、活性化酸素を産生して呼吸器粘膜を損傷する

以外には直接の細胞障害性は知られておらず、マイコプラズマ感染における肺炎の病変形成には、宿主の免疫応

答が重要な役割を演じていると考えられている。この点、マイコプラズマ肺炎は自己限定的な疾患であり、幸いにして現時点では耐性菌感染が証明された肺炎の重症例は報告されていない。しかしながらマイコプラズマ感染症では肺炎を伴わない肺外発症のほうかより病像は多彩で重症化する場合もあり、耐性菌が蔓延しつつある現在、耐性菌感染による肺炎あるいは肺外発症の重症化を念頭に置いた診療と監視体制の強化が必要である。

## F 研究発表

### 論文発表

成田光生 マイコプラズマ感染症の基礎と臨床 小児マイコプラズマ肺炎の臨床 臨床と微生物 30, 47-51, 2003

成田光生, 富樫武弘 小児マイコプラズマ感染症診断における迅速診断キットの有用性 感染症学雑誌 77, 310-315, 2003

成田光生 感染症迅速診断の実際 マイコプラズマ 小児科 44, 1884-1890, 2003

田中裕士, 成田光生, 千葉弘文, 阿部庄作 マイコプラズマ肺炎の病態と治療戦略 分子呼吸器病 7, 553-555, 2003

### 学会発表

成田光生, 原田正平, 松本憲則, 山田 諭, 岡崎則男, 佐々木次雄 2002年北海道他田町で流行したマイコプラズマ感染症の抗生剤感受性について—第2報, 分離株の性状— 一般演題 日本小児科学会北海道地方会第256回例会 平成15年1月, 札幌

成田光生 マクロライド療法の現状と課題

薬剤耐性マイコプラズマ肺炎の最新の話 題 シンポジウム 第4回札幌マクロライド研究会 平成15年2月, 札幌

成田光生 マイコプラズマ肺炎の臨床と薬剤耐性菌の出現 教育講演 平成14年度希少感染症診断技術研修会 平成15年2月, 東京

成田光生 マイコプラズマ肺炎 診断, 耐性菌, 発症機構に関する最近の話題 ランチョンセミナー 第17回日本小児救急医学会 平成15年6月, 大宮

成田光生 マイコプラズマ肺炎 診断, 耐性菌, 発症機構に関する最近の話題 教育講演 札幌市小児科医会・講演会 平成15年6月, 札幌

成田光生, マクロライド耐性 *M. pneumoniae* による肺炎の臨床と分離株の性状 一般演題 第30回日本マイコプラズマ学会学術集会 平成15年10月, 東京

成田光生 マイコプラズマ感染症 診断, 耐性菌, 発症機構に関する最近の話題 特別講演 第8回栃木小児感染症研究会 平成15年11月, 宇都宮

成田光生 マイコプラズマ感染症 診断, 耐性菌, 発症機構に関する最近の話題 特別講演 第7回徳島小児感染症研究会 平成15年11月, 徳島

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

百日咳菌、ンフテリア菌、マイコプラズマ等の臨床分離  
菌の収集と分子疫学的解析に関する研究

*Haemophilus influenzae* 臨床分離株の型別分布及び薬剤感受性分布  
に関する研究

分担研究者 荒川宜親 国立感染症研究所 細菌第二部長

**研究要旨** 主に呼吸器材料より分離された *Haemophilus influenzae* 634 株を用いて生物型、血清型、薬剤感受性、薬剤耐性機構を調べた。生物型は 2, 3, 1 の順に多く血清型は 95% が nontypeable であった。耐性率はアンピシリン 14.7%、アンピシリン/スルハクタム 7%、セファクロル 17%、クロラムフェニコール 3.5%、クラリスロマイシン 1% であった。β-ラクタマーゼ産生株は 61 株 (9.6%) でうち 58 株が TEM-1 型、3 株が ROB-1 型であった。BLNAR 株は 29 株 (4.9%) であった。従来から見られたペニシリン系薬耐性株の他にセフェム系薬またはニューキノロン薬に耐性ないし低感受性の株も見られ、今後も引き続きその動向を監視して行く必要がある。

**研究協力者**

新谷三春

(国立感染症研究所 細菌第二部)

**A 研究目的**

*Haemophilus influenzae* (インフルエンサ菌) は、肺炎球菌、*Moraxella catarrhalis* とともに小児・成人の気道感染症の主要な起因菌である。また b 型莢膜保有株は、乳児、小児の敗血症や髄膜炎をはじめとする重篤な侵襲性感染症の主要な起因菌でもある。

これらの感染症の予防や治療に役立てるため *H. influenzae* 感染症の疫学的解析を目的として臨床分離株について生物型、血清型、遺伝子型などの型別、薬剤感受性、耐性機構などについて予備調査を行った。

**B 研究方法**

**供試菌株** 2002 年までに、関西地区、関東地区の医療機関、検査機関において、咽頭拭い液、喀痰などの主に呼吸器材料から分離され *H. influenzae* と同定された臨床分離株の譲渡を受け、研究に用いた。

**同定法** 菌をチョコレート寒天培地上で再分離し、ID テスト・HN-20 ラピント「ニノスイ」(日水製薬)を用い、溶血性テストを加え、必要に応じてポルフィリンテストを行って再同定した。

**生物型別** ID テスト・HN-20 ラピント「ニノスイ」(日水製薬)を用いた。

**血清型別** ファティレクト ヘモフィルス テスト (ファルマシア) 及びインフルエンサ菌莢膜型別用免疫血

清「生研」(テンカ生研)を用いた。

**薬剤感受性試験** NCCLS 法に準じた微量液体希釈法により行った。試験用培地として *Haemophilus Test Medium* またはミューラーヒントンフイヨン「栄研」(栄研化学)にストレプト・ヘモサプリメント「栄研」(栄研化学)を加えた培地を用いた。

**β-ラクタマーゼ遺伝子型別** TEM-1型及びROB-1型に特異的なプライマーを用いPCR法により行った。

**ニューキノロン耐性機構** ニューキノロンに耐性を示した株の *gyrA*、*gyrB* 及び *parC*、*parE* の QRDR を含む領域の塩基配列を決定し *H influenzae* Rd 株のそれと比較して変異を調べた。また Efflux pump inhibitor であるセセルピン、CCCP の MIC への影響を調べた。

(倫理面への配慮) 国立感染症研究所医学研究倫理審査委員会規程を遵守し、患者の匿名性も保たれた。

## C 研究結果

集められた分離株を再同定したところ 738 株中 *H influenzae* は 634 株であった(表 1)。他の *Haemophilus* 属菌としては *H parainfluenzae*、*H haemolyticus*、*H parahaemolyticus* が混入していた。採取部位は呼吸器が大部分であった(上下気道合わせて 93%) (表 2)。

生物型については 2 型が最も多く(44.5%)、次いで 3 型(25.6%)、1 型(14.2%)の順であった。血清型では莢膜を持たない nontypeable が最も多く(95.1%)、次に b 型(3.3%)が多かった(表 2、表 3)。

薬剤耐性株の比率の比較的高いものはアンピシリン 14.7%、アンピシリン/スルハクタム 7%、セファクロル 17%、クロラムフェニコール 3.5%、

クラリスロマイシン 1%であった(表 6)。セフトキシム、セフトキシム、セフトキシムの MIC が  $>2 \mu\text{g/ml}$  である菌株(NCCLS によって耐性のブレイクポイントが定められていないため「耐性」とは言えないか「感性」ではないか)それぞれ 5 株(0.84%)、4 株(0.67%)、37 株(6.2%)であった。

β-ラクタマーゼ活性を ID テスト・HN-20 ラピットに含まれる Acidimetry により検出したところ 61 株(9.6%)が陽性であった。これらのうち 58 株が TEM-1 型、3 株が ROB-1 型であった。

(表 4、表 5) β-ラクタマーゼ非産生かつアンピシリン耐性(アンピシリンの MIC が  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ )の株は 29 株(4.9%)であった。

ニューキノロン耐性菌株の遺伝子解析では *GyrA* 及び *ParC*、*ParE* で既報のものとは一致するアミノ酸変異は見られたほか、*GyrB*、*ParC* に新規のアミノ酸変異も見出した。セセルピン、CCCP による MIC の低下は見られなかった。

## D 考察

生物型の分布は我が国やカナダ、米国、オーストラリアにおける過去の報告と同様であった。

血清型は呼吸器由来株を中心に収集したことを反映して nontypeable (型別不能、莢膜非保有)が大半であったが、血液・髄液由来株はすべて b 型株(10 株)であり、これを除外しても 3.4% (21/624 株)の莢膜保有株が見つかった。このうち b 型以外の莢膜保有株は 10 株であった。今後我が国でも欧米諸国のように Hib コンジュケートワクチンが普及した場合 b 型が減少して他の莢膜型菌による感染症が相対的に増えることが予想される。現在髄膜炎などを対象とする診断キットに含まれる試薬は b 型のみを検出す

るものが多いので（インフルエンサ菌  
莢膜型別用免疫血清「生研」（テンカ  
生研）はすべて型の型に対応している）  
この点の改善が望まれる。莢膜関連遺  
伝子を標的とする PCR 法も血清型別  
に有用であるか市販キットはまたない  
ようである。

$\beta$ -ラクタマーゼ産生株は約 10%で  
我が国の最近の報告と大差はなく、約  
30%という米国、カナダでの報告より  
低いか、この差はペニシリン系薬の使  
い方の違いを反映していると思われる。  
逆に我が国では米国に比べ BLNAR  
の頻度が高いとされるか、我が国では  
経口セフェム系薬の使用頻度が高く、  
これらの薬剤は  $\beta$ -ラクタマーゼ産生  
菌には有効だが BLNAR には効果の低い  
ものもあり、BLNAR が選択された結果  
であろう。BLNAR の判定基準を「 $\beta$ -  
ラクタマーゼ非産生アンピシリン  
の MIC が  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ 」とすると、本研  
究では 4.9%が BLNAR であった。この  
値は我が国の 1997～1999 年の小児科  
領域における報告（3.0%）よりも増  
加している。また、例数は少ないが、  
 $\beta$ -ラクタマーゼ産生株の割合は、莢  
膜保有株（31 株）に限ると約 29%（9/31  
株）（表 4）、血液・髄液由来株（10 株）  
に限ると 20%（2/10 株）（表 5）とな  
り、呼吸器由来株が大半を占める  
（93%）全体における割合（9.6%、  
莢膜非保有株に限ると 8.6%（52/603  
株）、血液・髄液由来株以外に限ると  
9.5%（59/624 株））より高い傾向にあ  
る。肺炎桿菌等では、TEM-型  $\beta$ -ラク  
タマーゼの変異した  
ESBL (extended-spectrum  
 $\beta$ -lactamase) を産生し、セフトキシム  
やセフトキシムなどのオキシイミ  
ノセファロsporin（所謂第三世代セ  
ファロsporin）に耐性を獲得した株  
が欧米で増加し問題となっているか、

*H. influenzae* では今のところそのよ  
うな耐性株は確認されていない。しか  
し、TEM-1 型ペニシリン耐性であって  
も PBP の変異と重複する事により、ペ  
ニシリンのみならず、複数の経口セフ  
ァロsporin に高度耐性を獲得した  
株が散見されており、今後のそれらの  
動向を警戒する必要がある。

クラリスロマイシン（14 員環マクロ  
ライド）に対する耐性化率がアシスロ  
マシンの（15 員環マクロライド）に比  
べて高い（後者の感性 100%に対し、中  
間・耐性合わせて 12.6%）のは近年普  
及しているびまん性汎細気管支炎や  
副鼻腔炎への 14 員環マクロライドの  
適用の影響が考えられる。

キノロン耐性菌はまた頻度は低い  
か、最近キノロン系薬剤の新薬承認や  
注射薬の開発が続き、使用増が予想さ  
れるので耐性菌の増加を警戒する必  
要がある。

今回は、臨床材料や分離された患者  
の臨床背景毎に区分して解析をする  
事はできなかったが、16 年度、17  
年度の調査解析の中で、臨床背景を踏  
まえた解析を実施する事を計画して  
いる。

## E 結論

呼吸器系材料由来 *H. influenzae* 臨  
床分離株の生物型、血清型、 $\beta$ -ラク  
タマーゼ産生性は従来とあまり変化  
していないか、薬剤耐性株は漸増傾向  
にあり、今後とも監視が必要である。

## F 健康危険情報

今後、H1b ワクチンの導入により、  
敗血症や髄膜炎の症例を減らす事は  
可能であるか、nontypable による中耳  
炎などの感染症を予防する事はでき  
ない。今後、特に冬期等に各種の抗菌  
薬に耐性を獲得したインフルエンサ



菌による難治性の中耳炎など施設内感染症として幼稚園や保育園などで発生、流行する可能性があり、市中感染症(市囲感染症)の原因菌の一つとしてとして、その動向を監視する必要がある。

## G 研究発表

### 1 論文発表

なし

### 2 学会発表

新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親 呼吸器由来 *Haemophilus influenzae* の型別及び薬剤感受性について 平成 15 年度日米医学協力研究会第 8 回急性呼吸器感染症部会日本側合同会議 平成 16 年 1 月

## H 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特記すべきものなし

表1 分離菌の再同定結果

同定名等	株数	割合(%)
<i>H influenzae</i>	634	85.91
<i>H parainfluenzae</i>	27	3.66
<i>H haemolyticus</i>	21	2.85
<i>H parahaemolyticus</i>	1	0.14
<i>Oligella</i> spp	3	0.41
<i>Neisseria</i> spp	1	0.14
グラム陽性球菌	5	0.68
解析プロファイルにコート不収載	1	0.14
継代不能	45	6.10
総計	738	100.00

表2 採取部位別及び生物型別分離株数

採取部位	生物型								総計
	1	2	3	4	5	6	7	8	
上気道	45	146	81	16	18	5	27	4	342
下気道	34	113	74	5	15	0	5	0	246
耳	3	4	3	0	1	0	0	0	11
眼	0	5	2	0	1	0	0	0	8
消化器	0	1	0	0	0	0	1	0	2
泌尿器	0	1	0	0	0	0	0	0	1
生殖器	2	3	0	0	1	0	0	0	6
血液・髄液	5	4	0	1	0	0	0	0	10
不明	1	5	2	0	0	0	0	0	8
総計	90	282	162	22	36	5	33	4	634

表3 血清型別及ひ生物型別分離株数

生物型	血清型								総計	割合 (%)
	a	b	c	d	e	f	nontypeable			
1	0	9	1	0	3	2		75	90	14.20
2	0	10		0	2			270	282	44.48
3	0		1	0	1			160	162	25.55
4	0	2		0				20	22	3.47
5	0			0				36	36	5.68
6	0			0				5	5	0.79
7	0			0				33	33	5.21
8	0			0				4	4	0.63
総計	0	21	2	0	6	2		603	634	100.00
割合 (%)	0	3.31	0.32	0	0.95	0.32		95.11	100.00	

表4 莢膜保有株と非保有株におけるβラクトマーセ産生株の割合

	莢膜血清型						莢膜保有株計	莢膜非保有株計	全体
	a	b	c	d	e	f			
産生株	0	6	1	0	0	0	7	51	58
産生株合計	0	0	0	0	2	0	2	1	3
非産生株	0	6	1	0	2	0	9	52	61
全体	0	15	1	0	4	2	22	551	573
産生株の割合(%)	0	21	2	0	6	2	31	603	634
	28.6	50		33.3	0	29	8.6	9.6	

表5 血液・髄液由来株とそれ以外の株におけるβラクトマーセ産生株の割合

	血液・髄液由来株		血液・髄液以外		全体
	由来株	2	由来株	56	
産生株	TEM-1	2		3	58
	ROB-1	0		3	3
産生株合計		2		59	61
非産生株		8		565	573
全体		10		624	634
産生株の割合(%)		20		9.5	9.6