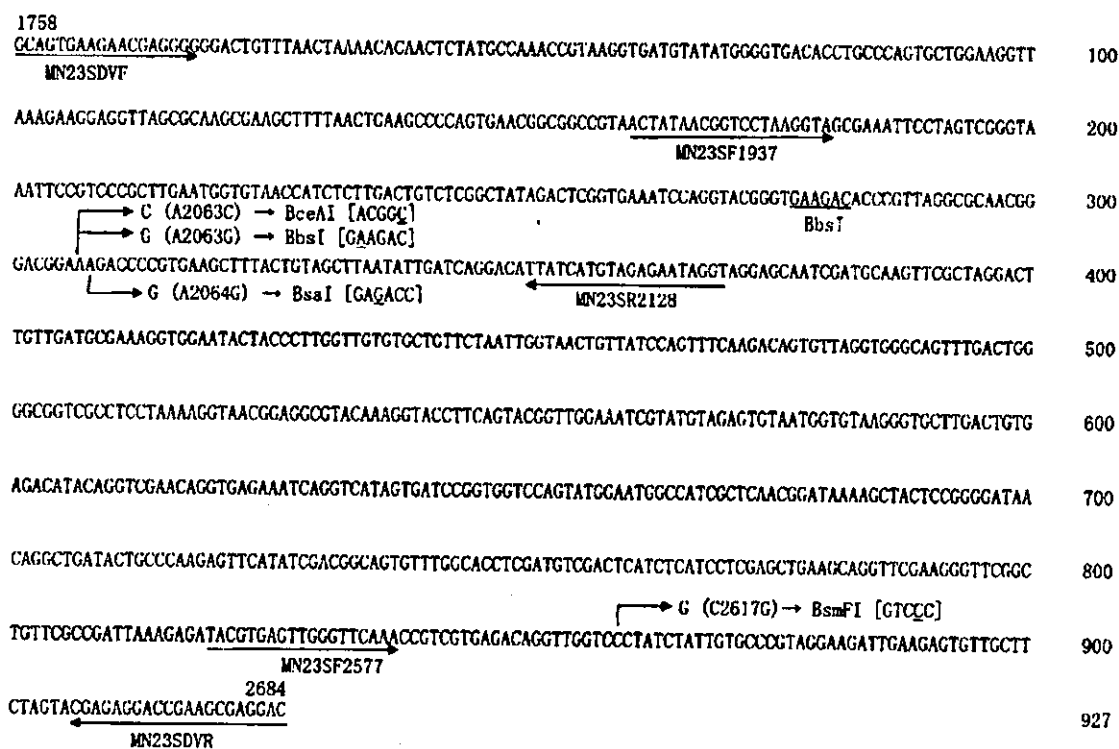


ロライド耐性遺伝子変異の有無をより簡便に検出する方法を開発し、その有用性を検討した。この方法の詳細については別に報告 (Matsuoka M, *et al.*, 論文発表の項目参照) が有るので、略述するにとどめる (図1)。すなわち必要領域を PCR 法にて増幅し、23S リボソーム RNA ドメインVの塩基番号2063番目におけるアデニンの変異に関しては、A から C への置換 (A2063C と表記, 以下同じ) に対して制限酵素 Bce AI による切断を用いて、また A2063G に対して Bbs I による切断を用いて、それぞれ検出した。また塩基番号 2064 番目におけるアデニンの変異に関しては、制限酵素 Bsa I による切断にて A2064G を検出した。さらに塩基番号 2617 番目におけるシトシンの変異に関しては、Bsm FI に

よる切断を用いて (C が他の塩基に変異したことは検出できるが、どの塩基に置換されたかまでは特定できず)、解析を行なった。

マイコプラズマ (*M.pneumoniae*) にはリボソーム RNA のオペロンは 1 個しか存在しないため、遺伝子型 (genotype) と表現型 (phenotype) は 1 対 1 で対応する。すなわち生菌による薬剤感受性試験を行なわなくても、リボソーム RNA の塩基配列決定により薬剤耐性となる遺伝子変異が検出されれば、その菌は耐性菌であると考えられる。また現在まで野生で確認されたマイコプラズマの薬剤耐性機構としては 23S リボソーム RNA ドメインVの point mutation のみであり、マイコプラズマ野生株の薬剤耐性はリボソーム

図1 PCR-RFLP 解析における制限酵素地図



詳細については論文発表 (Matsuoka M, *et al.*) を参照

RNA における遺伝子変異を検出することにより、ほぼ全例を把握できるものと考えられる。この点を踏まえて今年度は上記の PCR-RFLP の系を発展させ、発育の遅いマイコプラズマの分離培養過程を経ずに各種の臨床検体から直接にマクロライド耐性遺伝子変異の存在を検出する方法を開発した。本研究ではこの方法により、埼玉医科大学感染症科において保存されていた呼吸器感染症患者の喀痰 DNA 検体を用いて、薬剤耐性マイコプラズマの存在を retrospective に検討した。

臨床情報の収集については、発症からの発熱経過、施行された治療など、統計解析に必要で十分な情報を一定の基準で得るため、解析に必要な項目をまとめた書式のひな型を作

成し、主治医に記載を依頼した (図2)。臨床経過の解析に用いられる症例の条件としては、分離法または PCR 法にて咽頭あるいは喀痰におけるマイコプラズマ菌体の存在が証明され薬剤感受性が特定されたこと、血液検査にてマイコプラズマ抗体価が急性期で640倍以上またはペア血清で4倍以上の変動が認められ急性感染であることが証明されたこと、さらに、治療にマクロライド剤が使用されていたこと、を全て満たすものとした。

統計学的解析として平均値の比較には t-検定を用い、 $P < 0.05$ を有意の差と考えた。

図2 臨床データ記載表

医療機関名： _____

患者ID (カルテ番号)： _____

年齢： _____ 歳 性別： M F 基礎疾患：なし、あり (_____)

診断名：肺炎 気管支炎 上気道炎 他 (_____) 主治医の印象 (感受性・耐性・微妙)

年月日	病日	最高体温 (°C)	使用抗菌剤：一日投与量・投与方法 (経口・静注)		検体採取	遺伝子変異 (当方記載)
			1. (主剤)	2. (副剤)		
	0 (発熱日)					
	1					
	2					
	X (解熱日)					

本例をひな型として、主治医に臨床経過の記載を依頼した。

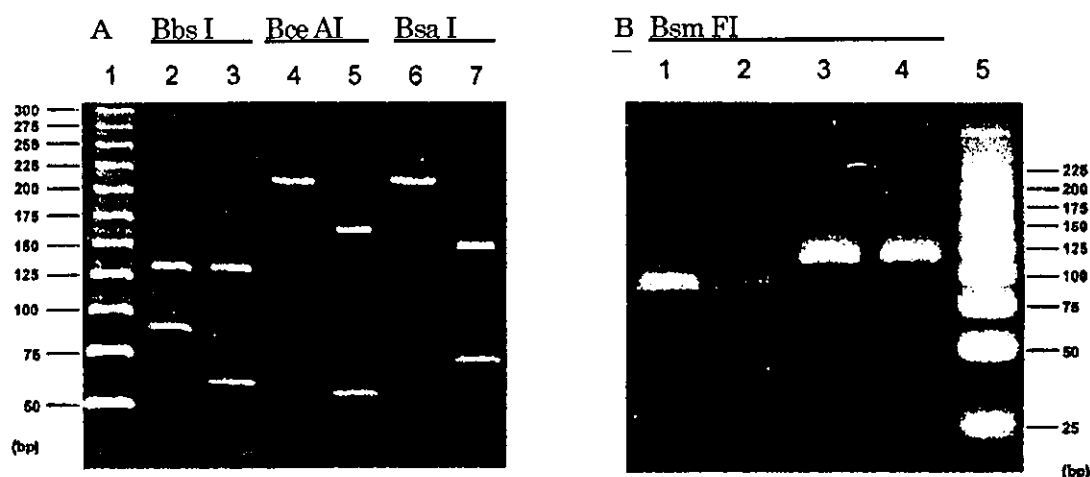
C. 研究結果

はじめに PCR-RFLP 解析による耐性遺伝子検出について、その代表的な結果を図3に示した。本法により A2063G, A2063C, A2064G, C2617X (XはC以外の塩基) の変異を明確に検出し得ることが確認された。

今年度までに性状解析が行なわれたマイコプラズマ野生株を表1にまとめた。培養法にては今年度は分離株数そのものが少なく、新たな耐性菌は分離されなかった。また合わせてPCR法による解析結果も表1にまとめた。培養法, PCR法, とともに1999年以前には耐性菌の出現は認められず、耐性化は2000年以後に急速に進んでいることが観察された。2000年以後における耐性化率は、培養法によると14.9%, PCR法によると15.0%で、両者の結果はほぼ一致していた。

また今年度までに本研究班にて収集したマクロライド耐性株全例と、得られた場合にはその株が分離された患者の臨床経過を、表2にまとめた。A2063Gが10株, A2063C, A2064G, C2617Gが各1株の合計13例であった。このうち臨床経過の詳細が得られたのは11例で、そのうち8例ではそれが第1選択か第2選択かは別として、マクロライド剤が臨床的には有効と判断されていた。ただしその発熱期間を具体的に検討すると、同時期に得られた感受性株感染症例26例においてはマクロライド剤を開始したのち解熱までの平均日数が1.3日であったのに対し耐性株感染症例では3.6日であり、耐性株感染症例ではマクロライド剤開始から解熱までの期間が統計学的に有意に延長していた。

図3 PCR-RFLP 解析による耐性遺伝子検出の代表的な結果



ゲルA; 標準株 (レーン2, 4, 6) の切断パターンとの差により、Bbs Iによる切断にてA2063G (レーン3) が、Bce AIによる切断にてA2063C (レーン5) が、Bsa Iによる切断にてA2064G (レーン7) が、それぞれ検出された。

ゲルB; 同様に、Bsm FIによる切断パターンの差によりC2617G (レーン3, 4) が検出された。詳細については論文発表 (Matsuoka M, *et al.*) を参照のこと。

表1 平成16年度までに解析されたマイコプラズマの性状

年	培養法			PCR		
	総分離数	耐性株数	耐性菌出現率 (%)	総陽性数	耐性遺伝子検出数	耐性遺伝子検出率 (%)
～1999	296	0	0	12	0	0
2000	10	1	10.0 %	9	4	44.4 %
2001	6	2	33.3	28	3	10.7
2002	12	3	25.0	44	5	11.3
2003	54	7	13.0	10	1	10.0
2004	5	0	0	8	2	25.0
計 *1	87	13	14.9	99	15	15.0

*1 ; 2000～2004年の計

表2 マクロライド耐性マイコプラズマ肺炎に対する抗生剤の臨床効果

遺伝子変異	患者	使用された抗生剤		病院/施設・地域
	年齢, 診断名	第1選択/効果	第2選択/効果	
A2063G	9 肺炎	CLDM/無効	<u>CAM/有効</u>	札幌鉄道 高知県衛研 高知県衛研
	3 肺炎	不明		
	4 肺炎	不明		
	2 肺炎	CDTR-PI/無効	<u>AZM/有効</u>	札幌鉄道
	9 肺炎	CAM/無効	AZM/無効	茅ヶ崎市立
	11 肺炎	CAM/無効	MINO/有効	茅ヶ崎市立
	11 肺炎	<u>AZM/有効</u>		茅ヶ崎市立
	7 肺炎	RKM/無効	AZM/無効	茅ヶ崎市立
	7 肺炎	CFDN, FOM/無効	<u>EM/有効</u>	茅ヶ崎市立
? 肺炎, 胸膜炎	<u>CAM/有効</u>		神奈川小児医療センター	
A2063C	12 肺炎	CAM/無効	<u>AZM/有効</u>	池田町立
A2064G	5 気管支炎	CCL/無効	<u>EM/有効</u>	茅ヶ崎市立
C2617G	7 発熱と咳嗽	<u>AZM/有効</u>		池田町立

CLDM; clindamycin, CAM; clarithromycin, CDTR-PI; cefditoren-pivoxil, AZM; azithromycin, MINO; minocycline, RKM; rokitamycin, CFDN; cefdinir, FOM; fosfomycin, EM; erythromycin, CCL; cefaclor. 下線はマクロライド剤が有効と判断された症例.

D. 考察

表2にはマクロライド耐性マイコプラズマが分離された症例の主治医の印象が要約されているが、これらは直接関連の無い施設における、別個の主治医の主観の無い印象である。そもそもマクロライドが第1選択であった場合と、セフェム系など本来マイコプラズマには無効の薬剤あるいは別のマクロライド剤が使われたあとの第2選択であった場合も合わせると、11例中8例において、マクロライド剤は臨床的に有効であったという印象が持たれている。上述のごとく現在の日本ではマイコプラズマ野生株の少なくとも15%前後はマクロライド耐性菌である。しかしながら多くの臨床医は日常診療上、そのような数字は実感していないものと考えられる。おそらく耐性菌感染であっても、臨床的にはマクロライド剤が奏功したと感じられている場合が多いのではないかと想像される。一方で、マクロライド剤投与開始から解熱までの平均日数を統計学的に検討すると、客観的には耐性菌感染症例では明らかにこれが延長していた。

これらの現象を総合すると、マクロライド耐性マイコプラズマ感染による肺炎においては、感受性菌感染と比較して、確かに解熱までの期間に延長は認められるものの、多くの場合それは主治医にとっては明らかに臨床的な問題として感じられるほどの差ではない、という結論が得られる。現在の医学常識においては、マイコプラズマ肺炎を疑った場合に有効な抗生剤を投与しないということは倫理的に認められないため、厳密にplacebo投与による自然経過との比較を行なうことは不可能であるが、1960年代における研究によれば、マイコプラズマ肺炎にplaceboを投与して自然経過を観察した場合、解熱までの期間は

8.1日であったとする報告が有る。この点、単純比較はできないが、マクロライド耐性マイコプラズマ肺炎における平均3.6日という解熱日数は確かに感受性菌よりは延長しているものの自然経過よりは明らかに短縮されている、とも考えられる。マクロライド耐性菌感染による肺炎であっても、マクロライド剤投与により臨床的には実際に何らかの薬効が得られている可能性も推測される。

昨年度報告のごとくマクロライド耐性マイコプラズマ菌のマクロライドに対する最小発育阻止濃度は桁違いに高く、マクロライドは組織移行性が良く組織内濃度が血中濃度より数十倍高くなる、という単純な理由でこの臨床的効果を説明するには無理が有る。ここで注目されるのがマクロライド剤の新作用であり、エリスロマイシンやクラリスロマイシンなどの14員環マクロライド、およびアジスロマイシンの15員環マクロライドには抗生剤としての抗菌作用に加えて、例えば緑膿菌感染症においてはそのバイオフィルムを形成するムチンの合成を阻害すること、あるいは肺炎球菌感染症においてはその毒素(pneumolysin)産生を抑制すること、などの多様な作用が有ることが報告されている。

そもそも肺炎マイコプラズマ(*M. pneumoniae*)には呼吸器粘膜細胞における活性酸素の過剰産生以外には、直接的な組織傷害性は無い。そして多くの臨床的および実験室的観察により、マイコプラズマ肺炎の病像は主として宿主の免疫応答により形成されている、という概念は確立されている。そしてこの免疫応答の中心として機能しているのが、IL-18、IL-8、Th1型サイトカイン、などの様々なサイトカインであると考えられ

ている。そして14-、15-員環マクロライド剤には肺胞マクロファージあるいは気管支上皮細胞からのこれらサイトカインの産生を抑制する作用の有ることも報告されている。

そこでマクロライド剤のマイコプラズマ肺炎に対する臨床効果をまとめると、病初期のマイコプラズマ感染成立から増殖過程では抗生剤としての抗菌作用が主体であり、その後、宿主の免疫応答が肺炎の病像を形成していく過程では抗菌作用と免疫修飾作用（抗炎症効果を示すサイトカイン抑制作用）の両方が重要であり、最終的に肺炎の病像が確立された後半では、抗菌作用とは別個に、免疫修飾作用も治療効果発現のうえで重要な役割を演じているという可能性が挙げられる。すなわち耐性菌による肺炎においては、経過の初期にマクロライド剤が使われても菌の発育に対する抑制効果は無いので確かに発熱期間は延長するが、一定時間が経過して免疫修飾作用（抗炎症効果）が表面に出る段階に至るとマクロライド剤投与により臨床症状は改善し、マクロライド剤が奏効した印象が持たれると解釈すれば、マクロライド耐性菌による肺炎でも多くの場合、主治医の印象は「自然経過ではなくマクロライド剤が奏効した」と感じられる現象を説明可能である。現在までにマクロライド耐性肺炎球菌肺炎においてもマクロライドが臨床的には奏効する現象が知られており、肺炎球菌感染症における‘*in vitro*–*in vivo* paradox’と呼ばれている。この現象との異同もまた興味深い問題点である。

E. 結論

上述のごとくマクロライド耐性マイコプラズマ感染症では、臨床病像として肺炎に限って言えば、それ自体には必ずしも重症化する

傾向が有るとは言えない。たとえ発症しても最低限自然治癒するか、あるいはマクロライドの免疫修飾作用（抗炎症効果）で制御可能である。したがって個人防衛の観点からは、マクロライド耐性マイコプラズマが野生に少なからず存在するとしても、当面は現行の14-、15-員環マクロライド剤を第1選択とした肺炎の治療で大きな問題は起こらないものと考えられる。

F. 健康危険情報

疫学的に集団防衛の観点から考えると、耐性菌が蔓延した場合にはマイコプラズマがマクロライドでは容易に不活化されないために患者からの生菌の排出が遷延し、それによりマイコプラズマ感染症の流行が拡大していく可能性が危惧される。実際に流行動向によれば、2004年第46週にはマイコプラズマ肺炎の定点当たり発生数が過去6年で最高を記録している。この現象がマクロライド耐性菌の出現と無縁ではない可能性が有る。

さらに、肺炎が病像の中心を占める成人におけるマイコプラズマ感染症とは異なり、小児科領域のマイコプラズマ感染症においては、急性脳炎などの肺外発症が決して稀ではない。宿主の免疫応答が病態の根本である肺炎とは状況が異なり、肺外発症の病態は一律ではなく、一部の病態ではその治療の上で菌自体を殺す必要の有る場合が想定される。耐性菌がそのような肺外発症を起こした場合には、重症化する可能性も危惧される。

以上のことを総合すると、マイコプラズマ感染症を制御する上で、実際に野生に存在する耐性菌の性状を解析しそれに基づいた治療方針を確立することは、やはり今後も重要な課題であると結論される。

G. 研究発表

論文発表

Mayumi Matsuoka, Mitsuo NARITA, Norio Okazaki, Hitomi Ohya, Tsutomu Yamazaki, Kazunobu Ouchi, Isao Suzuki, Tomoaki Andoh, Tsuyoshi Kenri, Yuko Sasaki, Atsuko Horino, Mihar Shintani, Yoshichika Arakawa, Tsuguo Sasaki.. Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. Antimicrob Agents Chemother 48; 4624-4630, 2004.

Mitsuo NARITA, Hiroshi Tanaka. Two distinct patterns of pleural effusions due to *Mycoplasma pneumoniae* infection. Pediatr Infect Dis J 23; 1069, 2004.

成田光生. 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。「百日咳菌、ジフテリア菌、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」厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）平成15年度総括・分担研究報告書 41-48, 2004.

成田光生. マクロライド耐性肺炎マイコプラズマ感染症. 感染症と化学療法 7; 11-14, 2004.

成田光生. 薬剤耐性マイコプラズマは普通に野生に存在する。—臨床と分離株の性状との discrepancy はなにを意味するか。医学のあゆみ 209; 545-549, 2004.

成田光生. 脳炎, 脳症, 髄膜炎—中枢神経の感染・炎症・免疫. マイコプラズマ脳炎. 小児内科 36; 1121-1124, 2004.

成田光生. 小児のマイコプラズマ肺炎. 感染と抗菌薬 7; 281-286, 2004.

成田光生. マクロライド耐性マイコプラズマの最近の知見と臨床上的の問題点. 小児科 45; 2321-2326, 2004.

田中 裕士, 成田光生. マイコプラズマ感染時の宿主反応. 最新医学 59; 2530-2536, 2004.

田中裕士, 藤井 偉, 成田光生, 阿部庄作. 呼吸器感染症の診断と治療. マイコプラズマ. 日本胸部臨床 63; S93-100, 2004.

成田光生. マイコプラズマ肺炎. 佐川慶介, 尾内一信 共編; 小児の肺炎 195-200, 医薬ジャーナル, 大阪, 2004.

学会発表

成田光生. 特別講演. 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. 第5回札幌マクロライド研究会. 平成16年1月, 札幌.

成田光生. 特別講演. 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. 第12回福岡小児感染研究会. 平成16年3月, 福岡.

成田光生. ランチョンセミナー. マイコプラズマ感染症の何がどこまでわかっているか. 病態解明への長い道. 第78回日本感染症学会. 平成16年4月, 東京.

成田光生. 特別講演. 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. 第10回熊本小児感染研究会. 平成16年5月, 熊本.

成田光生. 特別講演. 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. 第6回広島小児感染症フォーラム. 平

成 16 年 9 月, 広島.

Mitsuo NARITA. Luncheon seminar.
Current status of macrolide-resistant
Mycoplasma pneumoniae in Japan. The
1st Meeting of the Asian Organization for
Mycoplasmology. Oct. 2004, Tokyo.

成田光生. 特別講演. マイコプラズマの耐性
機序. 第 5 回三河耐性菌感染症研究会. 平
成 16 年 10 月, 知立.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

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、ジフテリア菌、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

ベトナムにおいて髄膜炎患児の髄液より分離された *Haemophilus influenzae* の型別分布、薬剤感受性分布及び PFGE パターン解析
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 ベトナムにおいて髄膜炎患児の髄液より分離された *Haemophilus influenzae* 79 株を用いて生物型、莢膜血清型、薬剤感受性、PFGE パターンを調べ、我が国の場合と比較考察した。生物型は 2, 1 の順に多く、莢膜の血清型はすべて b 型であった。β-ラクタマーゼ陽性率は 57 % で、我が国と比べ高かった。薬剤耐性率はアンピシリン 55.7 %、クロラムフェニコール 64.6 %、クラリスロマイシン 22.8 % であった。PFGE パターン解析により家族内の咽頭保菌者と児から分離された株が遺伝的に近似している事が確認され、両者の間で菌が伝達された可能性が示唆された。

研究協力者

久保田（松岡）眞由美

（国立感染症研究所 細菌第二部）

新谷三春

（国立感染症研究所 細菌第二部）

A. 研究目的

Haemophilus influenzae（インフルエンザ菌）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原菌である。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原菌でもある。

前年度は国内の呼吸器由来臨床分離株を中心に疫学的解析を行った。今年度は髄膜炎由来臨床分離株につ

いて収集と解析をすることとし、国内では分離頻度が低く短期間に収集することが難しいためベトナム国立衛生疫学研究所（NIHE）の協力を得てベトナムにおける分離株の譲渡を受けて型別、薬剤感受性、家族内伝播などについて解析を行った。

B. 研究方法

供試菌株：2000～2004 年に、ベトナムにおいて髄膜炎患児（1 か月～9 歳）の髄液から分離され *H. influenzae* と同定された臨床分離株 79 株を用いた。

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 ラピッド「ニッスイ」（日水製薬）を用いて再同定した。

生物型別：ID テスト・HN-20 ラピッド「ニッスイ」（日水製薬）を用いた。

血清型別：ファディレクト ヘモフィルス テスト（ファルマシア）を用いた。

薬剤感受性試験：Etest (AB BIODISK) を用いた。試験用培地として Haemophilus Test Medium を用いた。

β-ラクタマーゼ活性検出：ID テスト・HN-20 ラピッド「ニッスイ」（日水製薬）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。

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)：制限酵素として SmaI を用い、常法に従って行った。

(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

日本で *H. influenzae* と再同定され、各種薬剤の MIC を測定できた 79 株を解析の対象とした。採取部位はすべて髄液であった。

生物型については 2 型が最も多く (68.3%)、次いで 1 型 (22.8%)、3 型 (2.5%) の順であった (表 3)。莢膜の血清型はすべて b 型であった。

β-ラクタマーゼ活性を ID テスト・HN-20 ラピッドに含まれる Acidimetry 用試薬を用いて検出したところ 45 株 (57.0%) が陽性、34 株 (43.0%) が陰性であった (表 1、表 2)。β-ラクタマーゼの遺伝子型は陽性株のうち 44 株が TEM-1 型、1 株が ROB-1 型であった。

耐性株の比率の高い薬剤はアンピシリン (耐性化率 55.7%)、クロラムフェニコール (同 64.6%)、クラリスロマイシン (同 22.8%) であった (表 4)。セフトキシム、セフトリアキソン、セフトロキソン、メロペネム、レボフロキサシンに対してはすべての株が感受性であった。β-ラクタマーゼ非産生株の中にアンピシリンの MIC が $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ と判定された株は見られなかった。

患児髄液由来株 53 株の PFGE パターンを解析したところ 26 genotypes に型別された。

患児髄液由来株と、患児の親または祖父母 (健常者) からの咽頭スワブ由来 *H. influenzae* 株の PFGE パターンを比較した (図 1)。家族からも b 型株が分離された 8 組の症例において 1 組を除きパターンが一致した。

D. 考察

欧米での報告によれば *H. influenzae* の生物型は分離部位や莢膜血清型と相関があり、b 型株では 1 型が圧倒的に優位であるという。本研究ではベトナムでは欧米とは異なり 2 型が優位であることが明らかになった。日本では b 型株の生物型分布に関する最近のデータは少ないが、前年度の本分担研究及びその他の報告により、1 型が優位であるが 2 型も 1 型の半分程度以上の頻度であり、欧米とベトナムの中間的な分布と見られる。

Hib コンジュゲートワクチンは比較的高価でありベトナムでは一般的には未だ普及していないため、同ワクチン普及以前の欧米諸国とも同様に髄膜炎由来の分離株の莢膜血清型は

すべてb型であった。

β -ラクタマーゼ産生株は60%に近く、約30%という米国、カナダでの報告よりさらに高い。この差はペニシリン系薬剤の使い方の違いを反映していると思われる。我が国の場合は、前年度の本分担研究によれば例数は少ないが、血液・髄液由来株（10株、すべてb型）の20%（2/10株）が β -ラクタマーゼ産生株であった。これに関しては我が国の他の研究でも同程度の数値が報告されている。なお、我が国では呼吸器由来株の β -ラクタマーゼ陽性率は9.2%（54/588株、前年度の本分担研究データより算出）で血液・髄液由来株のそれよりも低い。ベトナムの呼吸器由来株についての β -ラクタマーゼ陽性率のデータはまだないが、髄液由来株で高率であることから我が国のそれより高いことが予想される。ベトナム分離株で β -ラクタマーゼ陽性率が高い理由は不明であるが、使用される抗生物質の種類の違いが反映しているのかも知れない。ただし、 β -ラクタマーゼの遺伝子を担う伝達性プラスミドの伝達能力や菌の中での複製効率や安定性が高まっている可能性もありプラスミドに関する詳しい検討が必要である。

今回調べた範囲では β -ラクタマーゼ非産生で、かつCSLI(旧NCCLS)の定めるブレイクポイントによりアンピシリン耐性（MIC \geq 4 μ g/ml）と判定された株は見られなかった。すなわち β -ラクタマーゼ非産生株ではアンピシリンのMICはすべて0.5 μ g/ml以下であった。前年度の本分担研究でも例数は少ないが血液・髄液由来株（10株）を含むb型株（21株）においていわゆる「BLNAR株」は見ら

れなかった。主に呼吸器由来の株（血液・髄液由来株は含まない）においては4.9%がBLNARであった（前年度の本分担研究）。BLNARをPBP3遺伝子の特定の部位が変異した株と定義すれば、上記の比率がもっと高くなる可能性はある。我が国では欧米に比べペニシリン系よりもセフェム系が多用されることから欧米よりもBLNARの出現率が高いとされ、問題視されている。

クラリスロマイシン（14員環マクロライド）に対する耐性化率は日本に比べて非常に高く、中間、耐性を合わせると90%を超える。

クロラムフェニコールの耐性化率も我が国のそれより非常に高く、65%にもなる。ベトナムにおいては使用される頻度が高いものと思われる。

セフトキサシム、セフトリアキソン、セフポドキシム、メロペネム、レボフロキサシンについては我が国におけるよりも感受性が高く、調べた範囲ですべての株が感受性であった。しかし、他のグラム陰性桿菌で見られるようないわゆる「ESBL」化したTEM型 β -ラクタマーゼを産生する株が出現する可能性はあり、TEM型ペニシリナーゼ産生株が多い地域では、引き続きオキシミノ系セファロsporinに対し耐性を獲得した株の出現に注意を払う必要がある。

H. influenzae においてもPFGEは識別力が高く、疫学において有用な解析手段である。本研究でも53株が26 genotypesに型別され、詳細な解析が可能になる。

PFGEを利用して家族内伝播を調べたところ7家族において患児髄液由来株と家族咽頭スワブ由来b型株と

でパターンが一致した。他の 1 家族では父親からの b 型株とは一致しなかった。これらの結果から健常者家族が咽頭に保菌している b 型株が乳幼児の髄膜炎起因菌となる可能性の高いことが示唆された。

E. 結論

ベトナムにおける髄膜炎患児の髄液由来株はいくつかの点で欧米や日本の株とは性状が異なった。薬剤耐性についてはアンピシリン、クラリスロマイシン、クロラムフェニコールに対する耐性化率が日本の株より高かった。PFGE 解析により、家族の咽頭保菌株と患児の髄膜炎からの分離株が遺伝的に極めて近縁の関係にある事が確認され、両者間での菌株の伝達の可能性が強く示唆された。

F. 健康危険情報

ベトナムでは髄膜炎由来 *H.*

influenzae の β -ラクタマーゼ陽性率が 60 % に近く、約 20 % の日本より非常に高い。ベトナムをはじめ東南アジアとの人的交流がさらに盛んになれば伝達性プラスミドに担われた β -ラクタマーゼ遺伝子が日本にも広がる可能性がある。日本では他に PBP3 変異による経口セファロsporin 耐性株も増えつつあり、これらに β -ラクタマーゼ遺伝子が伝達された場合、さらに高度な耐性株が出現する可能性もあり警戒が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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. 患児の性別及び分離菌の耐性型別分離頻度

患児の 性別	患児数=分離株数 (割合、%)		
	総計	β -ラクタマーゼ産生株	β -ラクタマーゼ非産生株
男児	44 (55.7)	28 (35.4)	16 (20.3)
女児	35 (44.3)	17 (21.5)	18 (22.8)
総計	79 (100.0)	45 (57.0)	34 (43.0)

表 2. 患児の月齢分布及び分離菌の耐性型別分離頻度

患児の 月齢	患児数=分離株数 (割合、%)		
	総計	β -ラクタマーゼ産生株	β -ラクタマーゼ非産生株
1-6	33 (41.8)	17 (21.5)	16 (20.3)
7-12	35 (44.3)	22 (27.8)	13 (16.5)
13-24	10 (12.7)	5 (6.3)	5 (6.3)
>24	1 (1.3)	1 (1.3)	0 (0.0)
総計	79 (100.0)	45 (57.0)	34 (43.0)

表 3. 生物型別分離頻度

生物型	分離株数 (割合、%)
1	18 (22.8)
2	54 (68.3)
3	2 (2.5)
4	3 (3.8)
5	1 (1.3)
6	0 (0.0)
7	1 (1.3)
8	0 (0.0)
総計	79 (100.0)

表 4. 薬剤感受性分布 (79 株)

Antimicrobial	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			% by category*		
	Range	50%	90%	Susceptible	Intermediate	Resistant
ampicillin	0.125 ~ >256	8	>256	43.0	1.3	55.7
ampicillin/sulbactam	0.12/0.06 ~ 4/2	1/0.5	2/1	98.7		1.3
cefotaxime	<0.016 ~ 0.064	0.016	0.032	100.0		
ceftriaxone	<0.016 ~ 0.032	<0.016	<0.016	100.0		
cefaclor	1 ~ >256	2	2	98.7		1.3
cefpodoxime	0.016 ~ 0.064	0.064	0.064	100.0		
meropenem	0.032 ~ 0.25	0.125	0.125	100.0		
azithromycin	1 ~ 8	4	4	93.7		
clarithromycin	4 ~ 32	16	32	6.3	70.9	22.8
levofloxacin	0.008 ~ 0.032	0.016	0.032	100.0		
chloramphenicol	0.5 ~ >256	16	64	35.4		64.6
Rifampicin	0.064 ~ 256	0.25	0.5	98.7		1.3

* Break points are those advocated by the NCCLS for use in MIC determinations with *H. influenzae* .

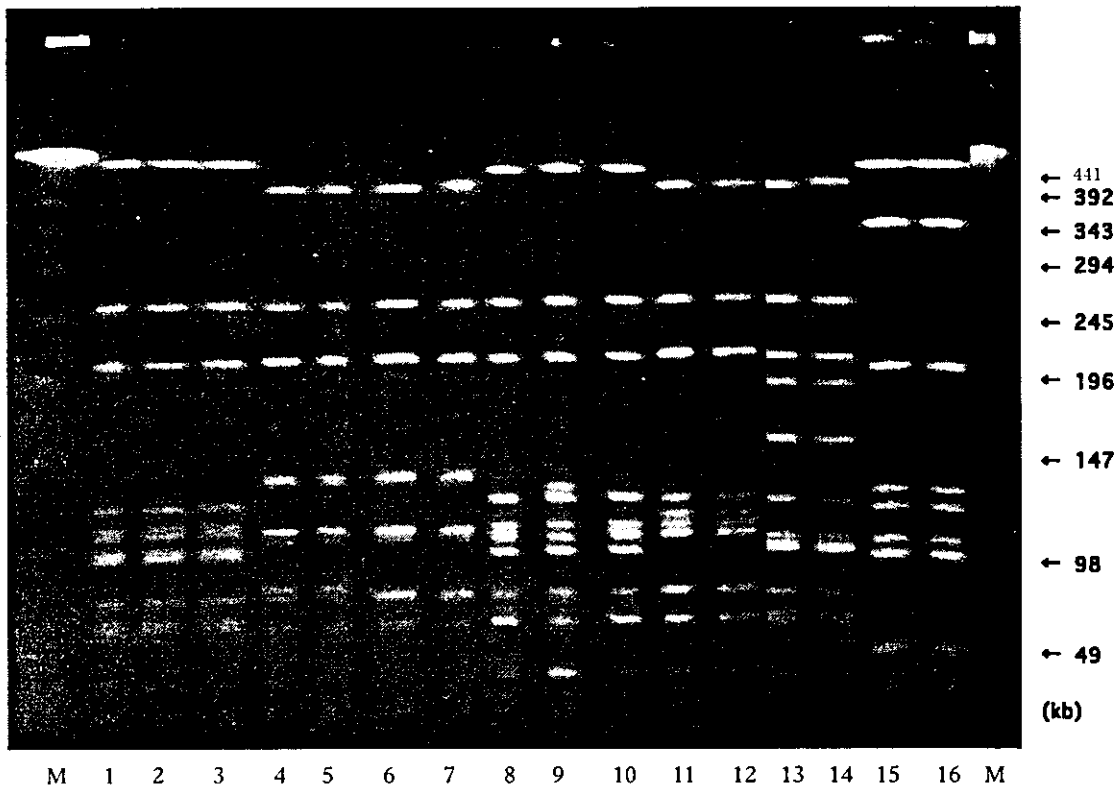


図1. 患児及び家族（健常者）からの分離株の PFGE パターンの比較
レーン

M. 分子量マーカー

- | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. 患児 1 (6 カ月 女 児) の 髄 液 由 来 株 2. 患児 1 の 母 親 の 咽 頭 ス ワ プ 由 来 株 3. 患児 1 の 父 親 の 咽 頭 ス ワ プ 由 来 株 4. 患児 2 (5 カ 月 男 児) の 髄 液 由 来 株 5. 患児 2 の 母 親 の 咽 頭 ス ワ プ 由 来 株 6. 患児 3 (13 カ 月 男 児) の 髄 液 由 来 株 7. 患児 3 の 母 親 の 咽 頭 ス ワ プ 由 来 株 8. 患児 4 (13 カ 月 男 児) の 髄 液 由 来 株 9. 患児 4 の 母 親 の 咽 頭 ス ワ プ 由 来 株 10. 患児 4 の 祖 母 の 咽 頭 ス ワ プ 由 来 株 | <ol style="list-style-type: none"> 11. 患児 5 (5 カ 月 女 児) の 髄 液 由 来 株 12. 患児 5 の 母 親 の 咽 頭 ス ワ プ 由 来 株 13. 患児 6 (7 カ 月 女 児) の 髄 液 由 来 株 14. 患児 6 の 母 親 の 咽 頭 ス ワ プ 由 来 株 15. 患児 7 (8 カ 月 男 児) の 髄 液 由 来 株 16. 患児 7 の 母 親 の 咽 頭 ス ワ プ 由 来 株 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

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

ヘモフィルス・インフルエンザ感染症の臨床と分離菌の解析

分担研究者 山崎 勉（埼玉医科大学感染症科・感染制御科講師）

研究協力者 上原すゞ子（千葉大学、埼玉医科大学）

研究要旨：薬剤耐性インフルエンザ菌が、小児肺炎の臨床に及ぼす影響を検討した。また、b型インフルエンザ菌による髄膜炎に罹患した患児における、血清抗polyribosyl ribitol phosphate (PRP)抗体を経時的に測定した。インフルエンザ菌のみが起炎菌として検出された小児肺炎86例について、薬剤感受性や薬剤耐性遺伝子の保有が、経過に及ぼす影響を検討した。喀痰由来インフルエンザ菌のABPCに対する最小発育阻止濃度（MIC）を、微量液体希釈法により測定し、ニトロセフィン法にて β -lactamase産生性、インフルエンザ菌遺伝子検出試薬（湧永製薬）により、耐性遺伝子である *pbp3-1*, *pbp3-2* を検出した。ABPC感受性および薬剤耐性遺伝子の保有により、経過中の最高白血球値、最高CRP値、解熱までに要した日数等について検討した。さらに、治療に用いた抗菌薬により、ペニシリン系抗菌薬による治療群（A群）とペニシリン以外の抗菌薬による治療群（B群）に分類し、各々で炎症反応等の経過を比較した。インフルエンザ菌のABPCに対するMICが $4\mu\text{g/ml}$ 以上、 $2\mu\text{g/ml}$ 、 $1\mu\text{g/ml}$ 以下のものは、各々12例（13.9%）、21例（24.4%）、53例（61.7%）であった。各群について、経過中の最高白血球数の平均値（ μ/l ）/最高CRPの平均値（ mg/dl ）/解熱までに要した日数の平均値は、各々11,754/13,161/12,365、1.8/3.3/2.8、1.9/1.7/1.8であった。ABPCのMICが $2\mu\text{g/ml}$ の場合は、経過中の最高白血球数の平均値および最高CRPの平均値が、他の場合に比べてやや高値であったが、有意差はみられなかった。解熱までに要した日数の平均は、各群で同様であった。抗菌薬による治療に関して、ABPCのMICが $2\mu\text{g/ml}$ の場合、最高CRP値は、A群がB群より高値であったが、解熱までに要した日数は、両群とも同様であった。一方、ABPCのMICが $4\mu\text{g/ml}$ 以上の場合は、解熱までに要した日数は、A群ではB群に比べて遷延していた。ABPC感受性インフルエンザ菌による肺炎では、*pbp-3* 遺伝子の変異による炎症反応や発熱の遷延等への影響は明らかでなかった。b型インフルエンザ菌による髄膜炎患児5例より、経時的に採取した血清を用いて、抗PRP抗体を測定した。初回検査は、第0～10病日に施行したが、いずれの検体においても長期の感染防御抗体価とされる $1.0\mu\text{g/ml}$ 以上であり、その後も $1.0\mu\text{g/ml}$ 以下となることはなかった。

A. 研究目的

平成15年度に、気道由来ヘモフィルス・インフルエンザ（インフルエンザ菌）の耐性遺伝子の保有状況について検討した。一方、インフルエンザ菌（無莢膜株）の小児の肺炎・気管支炎における病原的役割に関しては、海外では十分に認識されていない。さらに、小児の肺炎の病原診断法に関しては、議論も多い。そこで、小児由来喀痰を用いた洗浄培養（簡易法）の、肺炎・気管支炎の病原診断における有用性、ならびにインフルエンザ菌が小児の肺炎の原因菌として重要であることを確認する。また、昨年度に検出された薬剤耐性インフルエンザ菌が、臨床経過に及ぼす影響の実際を明らかにする。インフルエンザ菌感染症における、血清抗体反応に関して、昨年度は気道感染症児において、インフルエンザ菌（無莢膜株）に対する抗体測定を施行したが、十分な感度・特異性は得られなかった。今年度は、インフルエンザ菌（b型）による髄膜炎に罹患した患児における、血清抗体反応を測定した。

B. 研究方法

肺炎・気管支炎にて埼玉医科大学病院を受診した患児より採取された、喀痰60検体を用いて、生理食塩水にて喀痰を3回洗浄する方法（3回洗浄法）と1回洗浄する方法（簡易法）との比較を行った。肺炎・気管支炎罹患児501例において、簡易法により原因菌を同定した。さらに、平成12年以降に受診し、インフルエンザ菌のみが起炎菌として検出された小児肺炎86例について、薬剤感受性や薬剤耐性遺伝子の保有が、経過に及ぼす影響を

検討した。インフルエンザ菌のABPC感受性を微量液体希釈法により測定し、最小発育阻止濃度（MIC）により、 $4\mu\text{g/ml}$ 以上、 $2\mu\text{g/ml}$ 、 $1\mu\text{g/ml}$ 以下に分類した。ニトロセフィン法にて β -lactamase産生性を検査し、インフルエンザ菌遺伝子検出試薬（湧永製薬）により、耐性遺伝子である *pbp3-1*、*pbp3-2* を検出した。ABPC感受性および薬剤耐性遺伝子の保有により、経過中の最高白血球値、最高CRP値、解熱までに要した日数等について検討した。さらに、治療に用いた抗菌薬により、ペニシリン系抗菌薬による治療群（A群）とペニシリン以外の抗菌薬による治療群（B群）に分類し、各々で炎症反応等の経過を比較した。

インフルエンザ菌による髄膜炎に罹患した小児5例より、経時的に血清を採取し、抗 polyribosyl ribitol phosphate (PRP) 抗体の測定を施行した。抗 PRP 測定は、BINDAZIME Human anti *Haemophilus influenzae* enzyme immunoassay kit (The Binding Site Ltd.)により、施行した。倫理面への配慮は、倫理規定に沿った。

C. 研究結果

洗浄喀痰培養法の検討：

小児の喀痰60検体で、3回洗浄法と簡易法とを比較したところ、各々の結果が一致したものが79%、部分的に一致したもの（3回洗浄法で判定された菌を含む複数菌が、簡易法で起炎菌として判定されたもの）が5%、不一致が16%であった。簡易法による洗浄喀痰培養法により、501検体中でインフルエンザ菌が起炎菌として判定されたものは、37.1%を占めた（表1）。

インフルエンザ菌肺炎の検討：

インフルエンザ菌のみが起炎菌として検出された小児肺炎 86 例に関して、ABPC の MIC が $4\mu\text{g/ml}$ 以上、 $2\mu\text{g/ml}$ 、 $1\mu\text{g/ml}$ 以下のものは、各々 12 例 (13.9%)、21 例 (24.4%)、53 例 (61.7%) であった。各群について、経過中の最高白血球数の平均値 (μ/l)/最高 CRP の平均値 (mg/dl)/解熱までに要した日数の平均値は、各々 11,754/13,161/12,365、1.8/3.3/2.8、1.9/1.7/1.8 であった (表 2)。ABPC の MIC が $2\mu\text{g/ml}$ の場合は、経過中の最高白血球数の平均値および最高 CRP の平均値が、他の場合に比べてやや高値であったが、有意差はみられなかった。解熱までに要した日数の平均は、各群で同様であった。

抗菌薬による治療に関して、ABPC の MIC が $2\mu\text{g/ml}$ の場合、最高 CRP 値は、A 群が B 群より高値であったが、解熱までに要した日数は、両群とも同様であった (表 3)。一方、ABPC の MIC が $4\mu\text{g/ml}$ 以上の場合は、解熱までに要した日数は、A 群では B 群に比べて遷延していた。ABPC 感受性インフルエンザ菌による肺炎では、*pbp-3* 遺伝子の変異による炎症反応や発熱の遷延等への影響は明らかでなかった (表 4)。

髄膜炎患児における抗 PRP 抗体：

表 5 に、b 型インフルエンザ菌による髄膜炎患児 5 例より、経時的に採取した血清における、抗 PRP 抗体の推移を示す。初回検査は、第 0-10 病日に施行したが、いずれの検体においても $1.0\mu\text{g/ml}$ 以上であり、その後も $1.0\mu\text{g/ml}$ 以下になることはなかった。

D. 考察

今年度の検討において、平成 15 年度に、耐性遺伝子の保有状況を検討した気道由来インフルエンザ菌 (無莢膜株) は、実際に小児の肺炎・気管支炎の起炎菌であり、検出頻度が最も高いことが示された。インフルエンザ菌のみが起炎菌として検出された小児肺炎で、ABPC の MIC が $2.0\mu\text{g/ml}$ の場合は、ペニシリン系抗菌薬の治療された A 群では、ペニシリン系抗菌薬以外で治療された B 群より、CRP は高値であったが、解熱までに要した日数は同様であった。即ち、ABPC の MIC が $2.0\mu\text{g/ml}$ 程度の場合は、治療薬としてペニシリン系抗菌薬が推奨される。一方、ABPC の MIC が $4.0\mu\text{g/ml}$ 以上の場合は、A 群では B 群に比べて解熱までの日数が遷延する傾向にあり、治療にはセフェム系等の抗菌薬が考慮される。ABPC 感受性インフルエンザ菌による肺炎では、*pbp-3* 遺伝子の変異数が 2 つであっても、炎症反応はむしろ軽微で、発熱の遷延等への影響はみられなかった。即ち、ABPC 感受性菌における *pbp-3* 遺伝子の変異は、抗菌薬の選択を含めた臨床における意義は少ないものと判断される。これらの結果は、日本小児呼吸器疾患学会ならびに日本小児感染症学会による「小児呼吸器感染症診療ガイドライン 2004」が作成される過程において、ガイドライン作成の根拠としても使用された。

b 型インフルエンザ菌による髄膜炎患児における、血清抗 PRP 抗体の推移に関して、いずれの検体においても長期の感染防御抗体価とされる $1.0\mu\text{g/ml}$ 以上の値をとっていた。他施設におけるこれまでの報告では、小児の b 型インフルエンザ

菌髄膜炎症例では $1.0 \mu\text{g/ml}$ 以下の値をとっているものが多い。 γ -グロブリン療法等が抗体価の経過に影響している可能性もあり、今後さらに検討を重ねたい。b型インフルエンザ菌の予防接種は、わが国では来年度中の導入は難しいとされるが、予防接種導入前の抗 PRP 抗体を測定することは、疫学的にも意義あるものと考えられる。

E. 結論

インフルエンザ菌による小児肺炎の治療で、ABPC の MIC が $2.0 \mu\text{g/ml}$ 以下の場合には、治療薬としてペニシリン系抗菌薬が推奨され、*pbp-3* 遺伝子の変異の臨床経過に及ぼす影響は少なかった。一方、ABPC の MIC が $4.0 \mu\text{g/ml}$ 以上の場合には、抗菌薬治療としてセフェム系等の選択が考慮される。臨床分離株について、抗菌薬感受性、 β -ラクタマーゼ産生性、薬剤耐性遺伝子の解析を、さらに経時的に施行し、「小児呼吸器感染症診療ガイドライン 2004」で推奨した抗菌薬療法の妥当性についても検討したい。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 橋北義一, 岸悦子, 高橋俊, 河村亨, 舘良美, 小山幸枝, 須藤幸枝, 板橋明, 山崎勉, 原島宏子, 上原すゞ子, 佐々木望, 前崎繁文: 小児の髄膜炎における迅速抗原検査と培養検査の比較検討. 臨床微生物迅速診断研究会誌 (JARMAN), 14: 133-142, 2004
- 2) 小児呼吸器感染症診療ガイドライン作成委員会 (監修: 上原すゞ子, 砂川慶

介) (作成委員: 江口博之, 尾内一信, 岡田賢司, 黒崎知道, 春田恒和, 満田年宏, 山崎勉): 小児呼吸器感染症診療ガイドライン 2004. 協和企画, 東京, 2004 年 11 月

- 3) 砂川慶介, 岩田敏, 生方公子, 山崎勉: 抗菌薬耐性の肺炎球菌およびインフルエンザ菌への対応. 薬の知識, 55: 293-308, 2004.

- 4) 山崎勉: 中枢神経系感染症. 感染症診断に必要な微生物検査 (監修: 菅野治重, 相原雅典), ライフサイエンス, 東京, 印刷中

- 5) Yamazaki T, Murayama K, Ito A, Uehara S, Sasaki N: Epidemiology of community-acquired pneumonia in children. Pediatrics, 115:517, 2005.

- 6) Murayama K, Yamazaki T, Ito A, Uehara S, Sasaki N: Simplified semi-quantitative culture using washed sputum from children with lower respiratory tract infections. J Clin Pathol, In press

2. 学会発表

- 1) 伊東敦子, 山崎勉, 熊倉理恵, 上原すゞ子, 佐々木望, 前崎繁文: 小児の喀痰由来 *H. influenzae* および *S. pneumoniae* の薬剤感受性および耐性遺伝子の検出について. 第78回日本感染症学会総会, 平成16年4月6日, 東京
- 2) 伊東敦子, 山崎勉, 上原すゞ子, 佐々木望, 前崎繁文, 橋北義一, 板橋明: インフルエンザ菌による肺炎患児の臨床的検討. 第53回日本感染症学会東日本地方会総会, 平成16年10月21日, 新潟

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

なし

表 1. 洗浄喀痰培養（簡易法）による気管支炎・肺炎の起炎菌（n=501）

<i>H. influenzae</i>	37.1%
<i>S. pneumoniae</i>	19.6%
<i>M. catarrhalis</i>	2.2%
Others	5.8%
No pathogen	35.3%

表 2. インフルエンザ菌が起炎菌であった小児肺炎の ABPC の MIC 値による比較

MIC (μ g/ml)	症例数	白血球最高値(μ l)	CRP 最高値(mg/dl)	解熱までの日数
≤ 1.0	53	12,365	2.8	1.8
2.0	21	13,161	3.3	1.7
$4.0 \leq$	12	11,754	1.8	1.9