

of a resistance gene into human bacteria directly from antibiotic-producing bacteria, as found in a workman who had continuous exposure to the antibiotic at the virginiamycin production plant; however, this route may occur only rarely [95].

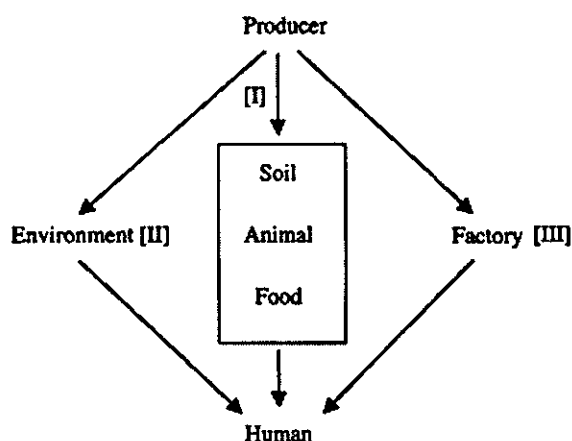


Fig. (31). Proposed pathway [I] 106, 107, 109, 111], pathway [II] [92], and pathway [III] [95] of transfer of resistance genes from producers to humans.

ABBREVIATIONS

ABC transporter	=	ATP-binding cassette transporter
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
EM	=	Erythromycin
<i>ere</i>	=	Erythromycin resistance esterase
G+C content	=	GC content
HJM	=	3''-hydroxyjosamycin
HMDM I	=	3''-hydroxylmaridomycin
JM	=	Josamycin
kDa	=	Kilo Dalton
MDM I	=	Hydroxyl maridomycin I
MDM III-M	=	4''-depropionylmaridomycin III
MDM III	=	Maridomycin III
MLS	=	Macrolide, lincosamide and streptogramin
<i>mph</i>	=	Macrolide phosphotransferase
OL	=	Oleandomycin
ORF	=	Open reading frame
PH IA	=	Pristinamycin IA
PMDM III	=	9-propionylmaridomycin III
PMDM III-M	=	4''-depropionyl-9-propionylmaridomycin III
rRNA	=	Ribosomal ribonucleic acid

sp.	=	Species
UDP	=	Uridine 5'-diphosphate

REFERENCES

- [1] Skinner, R.H. *J. Gen. Microbiol.*, **1982**, *128*, 2411.
- [2] Zalacain, M.; Cundliffe, E. *J. Bacteriol.*, **1989**, *171*, 4254.
- [3] Zalacain, M.; Cundliffe, E. *Gene*, **1991**, *97*, 137.
- [4] Zalacain, M.; Cundliffe, E. *Eur. J. Biochem.*, **1990**, *189*, 67.
- [5] Rosteck, P.R. Jr.; Reynolds, P.A.; Hersberger, C.L. *Gene*, **1991**, *102*, 27.
- [6] Schoner, B.; Geistlich, M.; Rosteck, P. Jr.; Rao, R.N.; Seno, E.; Reynolds, P.; Cox, K.; Burgett, S.; Hersberger, C. *Gene*, **1992**, *115*, 93.
- [7] Rodriguez, A.M.; Olano, C.; Vilches, C.; Mendez, C.; Salas, J.A. *Mol. Microbiol.*, **1993**, *8*, 571.
- [8] Olano, C.; Rodriguez, A.M.; Mendez, C.; Salas, J.A. *Mol. Microbiol.*, **1995**, *16*, 333.
- [9] Vilches, C.; Hernandez, C.; Mendez, C.; Salas, J.A. *J. Bacteriol.*, **1992**, *174*, 161.
- [10] Quiros, L.M.; Salas, J.A. *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 18234.
- [11] Quiros, L.M.; Hernandez, C.; Salas, J.A. *Eur. J. Biochem.*, **1994**, *222*, 129.
- [12] Jenkins, G.; Cundliffe, E. *Gene*, **1991**, *108*, 55.
- [13] Sasaki, J.; Mizoue, K.; Morimoto, S.; Omura, S. *J. Antibiot.*, **1996**, *49*, 1110.
- [14] Feldman, L.I.; Dill, I.K.; Holmlund, C.E.; Whaley, H.A.; Paterson, E.L.; Bohonos, N. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1963**, *161*, 54.
- [15] Flickinger, M.C.; Perlman, D. *J. Antibiot.*, **1975**, *28*, 307.
- [16] Nakahama, K.; Izawa, M.; Muroi, M.; Kishi, T.; Uchida, M.; Igarashi, S. *J. Antibiot.*, **1974**, *27*, 425.
- [17] Nakahama, K.; Kishi, T.; Igarashi, S. *J. Antibiot.*, **1974**, *27*, 433.
- [18] Nakahama, K.; Kishi, T.; Igarashi, S. *J. Antibiot.*, **1974**, *27*, 487.
- [19] Wiley, P.F.; Baczynskyj, L.; Dolak, L.A.; Cialdella, J.I.; Marshall, V.P. *J. Antibiot.*, **1987**, *40*, 195.
- [20] Marshall, V.P.; Cialdella, J.I.; Baczynskyj, L.; Liggett, W.F.; Johnson, R.A. *J. Antibiot.*, **1989**, *42*, 132.
- [21] Kuo, M.S.; Chirby, D.G.; Argoudelis, A.D.; Cialdella, J.I.; Coats, J.H.; Marshall, V.P. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1989**, *33*, 2089.
- [22] Cundliffe, E. *Gene*, **1992**, *115*, 75.
- [23] Cundliffe, E. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1992**, *36*, 348.
- [24] Hernandez, C.; Olano, C.; Mendez, C.; Salas, J.A. *Gene*, **1993**, *134*, 139.
- [25] Salas, J.A.; Hernandez, C.; Mendez, C.; Olano, C.; Quiros L.M.; Rodriguez, A.M.; Vilches, C. *Microbiologia*, **1994**, *10*, 37.
- [26] Aparicio, G.; Buche, A.; Mendez, C.; Salas, J.A. *FEMS Microbiol. Lett.* **1996**, *141*, 157.
- [27] Olano, C.; Rodriguez, A.M.; Mendez, C.; Salas, J.A. *Mol. Microbiol.* **1995**, *16*, 333.
- [28] Walsh, C. *Antibiotics-actions, origins, resistance*; ASM press: Washington, D. C., **2003**; pp. 89-234.
- [29] Quiros, L.M.; Aguirrezabalaga, I.; Olano, C.; Mendez, C.; Salas, J.A. *Mol. Microbiol.*, **1998**, *28*, 1177.
- [30] Quiros, L.M.; Carbajo, R.J.; Salas, J.A. *FEBS Lett.*, **2000**, *476*, 186.
- [31] Schulman, M.; Doherty, P.; Arison, B. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1993**, *37*, 1737.
- [32] Gourmelen, A.; Blondelet-Rouault, M.H.; Pemodet, J.L. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1998**, *42*, 2612.
- [33] Fierro, J.F.; Hardisson, C.; Salas, J.A. *J. Gen. Microbiol.*, **1987**, *133*, 1931.
- [34] Argoudelis, A.D.; Coats, J.H.; Mason, D.J.; Sebek, O.K. *J. Antibiotics*, **1969**, *22*, 309.
- [35] Argoudelis, A.D.; Mason, D.J. *J. Antibiotics*, **1969**, *22*, 289.
- [36] Argoudelis, A.D.; Coats, J.H. *J. Antibiot.*, **1969**, *22*, 341.
- [37] Coats, J.H.; Argoudelis, A.D. *J. Bacteriol.*, **1971**, *108*, 459.
- [38] Argoudelis, A.D.; Coats, J.H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 534.
- [39] Argoudelis, A.D.; Coats, J.H.; Mizsak, S.A. *J. Antibiot.*, **1977**, *30*, 474.
- [40] Marshall, V.P.; Patt, T.E.; Argoudelis, A.D. *J. Ind. Microbiol.*, **1986**, *1*, 17.
- [41] Lee, C.K.; Minami, M.; Sakuda, S.; Nihira, T.; Yamada, Y. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, *40*, 595.

- [42] Hou, C.T.; Perlman, D.; Schallcock, M.R. *J. Antibiot.*, 1970, 23, 35.
- [43] Kim, C.H.; Otake, N.; Yonehara, H. *J. Antibiot.*, 1974, 27, 903.
- [44] Kim, C.H.; Endo, T.; Yonehara, H. *J. Antibiot.*, 1988, 41, 73.
- [45] Fernando Fierro, J.; Vilches, C.; Hardisson, C.; Salas, J.A. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1989, 58, 243.
- [46] Suzuki, N.; Lee, C.K.; Nihira, T.; Yamada, Y. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, 42, 2985.
- [47] Nakajima Y. *J. Infect. Chemother.* 1999, 5, 61.
- [48] Roberts, M.C.; Sutcliffe, J.; Courvalin, P.; Jensen, L.B.; Rood, J.; Seppala, H. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, 43, 2823.
- [49] Leclercq, R. *Clin. Infect. Dis.*, 2002, 34, 482.
- [50] Weisblum, B. *Drug Resistance Updates*, 1998, 1, 29.
- [51] Leclercq, R.; Courvalin, P. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1991, 35, 1273.
- [52] Arthur, M.; Brisson-Noel, A.; Courvalin, P. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1987, 20, 783.
- [53] Barthelemy, P.; Autissier, D.; Gerbaud, G.; Courvalin, P. *J. Antibiot.*, 1984, 37, 1692.
- [54] Ounissi, H.; Courvalin, P. *Gene*, 1985, 35, 271.
- [55] Andreumont, A.; Gerbaud, G.; Courvalin, P. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1986, 29, 515.
- [56] Biskri, L.; Mazel, D. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, 47, 3326.
- [57] Arthur, M.; Autissier, D.; Courvalin, P. *Nucleic Acids Res.*, 1986, 14, 4987.
- [58] Noguchi, N.; Emura, A.; Matsuyama, H.; O'Hara, K.; Sasatsu, M.; Kono, M. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995, 39, 2359.
- [59] Noguchi, N.; Katayama, J.; O'Hara, K. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1996, 144, 197.
- [60] Matsuoka, M.; Endou, K.; Kobayashi, H.; Inoue, M.; Nakajima, Y. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1998, 167, 221.
- [61] Arthur, M.; Courvalin, P. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1986, 30, 694.
- [62] Wondrack, L.; Massa, M.; Yang, B.V.; Sutcliffe, J. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996, 40, 992.
- [63] O'Hara, K.; Kanda, T.; Kono, M. *J. Antibiot.*, 1988, 41, 823.
- [64] O'Hara, K.; Kanda, T.; Ohmiya, K.; Ebisu, T.; Kono, M. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1989, 33, 1354.
- [65] Kono, M.; O'Hara, K.; Ebisu, T. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1992, 97, 89.
- [66] O'Hara, K.; Yamamoto, K. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996, 40, 1036.
- [67] Noguchi, N.; Tamura, Y.; Katayama, J.; Narui K. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1998, 159, 337.
- [68] Katayama, J.; Okada, H.; O'Hara, K.; Noguchi, N. *Biol. Pharm. Bull.*, 1998, 21, 326.
- [69] Katayama, J.; Noguchi, N. *Biol. Pharm. Bull.*, 1999, 22, 227.
- [70] Taniguchi, K.; Nakamura, A.; Tsurubuchi, K.; Ishii, A.; O'Hara, K.; Sawai, T. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, 43, 2063.
- [71] Taniguchi, K.; Nakamura, A.; Tsurubuchi, K.; Ishii, A.; O'Hara, K.; Sawai, T. *Microbios.*, 1999, 97, 137.
- [72] Noguchi, N.; Katayama, J.; Sasatsu, M. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, 192, 175.
- [73] Matsuoka, M.; Inoue, M.; Endo, Y.; Nakajima, Y. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2003, 220, 287.
- [74] Alonso, A.; Sanchez, P.; Martinez, J.L. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, 44, 1778.
- [75] Yazawa, K.; Mikami, Y.; Sakamoto, T.; Ueno, Y.; Morisaki, N.; Iwasaki, S.; Furihata, K. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1994, 38, 2197.
- [76] Morisaki, N.; Hashimoto, Y. *J. Antibiot.*, 2001, 54, 157.
- [77] Chang, C.Y.; Chang, L.L.; Chang, Y.H.; Lee, T.M.; Chang, S.F. *J. Med. Microbiol.*, 2000, 49, 1097.
- [78] Peters, E.D.; Leverstein-van Hall, M.A.; Box, A.T.; Verhoef, J.; Fluit, A.C. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, 45, 2961.
- [79] Thungapathra, M.; Amita; Sinha, K.K.; Chaudhuri, S.R.; Garg, P.; Ramamurthy, T.; Nair, G.B.; Ghosh, A. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, 46, 2948.
- [80] Plante, I.; Centron, D.; Roy, P.H. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2003, 51, 787.
- [81] Kim, Y.H.; Cha, C.J.; Cemiglia, C.E. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002, 210, 239.
- [82] Arthur, M.; Andreumont, A.; Courvalin, P. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1987, 31, 404.
- [83] Kim, S.K.; Back, M.C.; Choi, S.S.; Kim, B.K.; Choi, E.C. *Mol. Cells*, 1996, 6, 153.
- [84] Nakamura, A.; Nakazawa, K.; Miyakozawa, I.; Mizukoshi, S.; Tsurubuchi, K.; Nakagawa, M.; O'Hara, K.; Sawai, T. *J. Antibiot.*, 2000, 53, 516.
- [85] Leclercq, R.; Carlier, C.; Duval, J.; Courvalin, P. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1985, 28, 421.
- [86] Brisson-Noel, A.; Courvalin, P. *Gene*, 1986, 43, 247.
- [87] Leclercq, R.; Brisson-Noel, A.; Duval, J.; Courvalin, P. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1987, 31, 1887.
- [88] Brisson-Noel, A.; Delrieu, P.; Samain, D.; Courvalin, P. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263, 15880.
- [89] Bozdogan, B.; Berrezouga, L.; Kuo, M.S.; Yurek, D.A.; Farley, K.A.; Stockman, B.J.; Leclercq, R. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, 43, 925.
- [90] Le Goffic, F.; Capmau, M.L.; Abbe, J.; Cerceau, C.; Dublanquet, A.; Duval, J. *Ann. Microbiol.* 1977, 128B, 471.
- [91] Allignet, J.; Loncle, V.; Mazodier, P.; El Solh, N. *Plasmid.*, 1988, 20, 271.
- [92] Allignet, J.; Liassine, N.; El Solh, N. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, 42, 1794.
- [93] Mukhtar, T.A.; Koteva, K.P.; Hughes, D.W.; Wright, G.D. *Biochemistry*, 2001, 40, 8877.
- [94] Bateman, K.P.; Thibault, P.; Yang, K.; White, R.L.; Vining, L.C. *J. Mass Spectrom.*, 1997, 32, 1057.
- [95] De Meester, C.; Rondelet, J. *J. Antibiot.*, 1976, 29, 1297.
- [96] Le Goffic, F.; Capmau, M.L.; Bonnet, D.; Cerceau, C.; Soussy, C.; Dublanquet, A.; Duval, J. *J. Antibiot.*, 1977, 30, 665.
- [97] Allignet, J.; Loncle, V.; Simenel, C.; Delepierre, M.; El Solh, N. *Gene*, 1993, 130, 91.
- [98] Allignet, J.; El Solh, N. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995, 39, 2027.
- [99] Rende-Fournier, R.; Leclercq, R.; Galimand, M.; Duval, J.; Courvalin, P. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1993, 37, 2119.
- [100] Hammerum, A.M.; Jensen, L.B.; Aarestrup, F.M. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998, 168, 145.
- [101] Werner, G.; Witte, W. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, 43, 1813.
- [102] Simjee, S.; White, D.G.; Meng, J.; Wagner, D.D.; Qaiyumi, S.; Zhao, S.; Hayes, J.R.; McDermott, P.F. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2002, 50, 877.
- [103] Soltani, M.; Beighton, D.; Philpott-Howard, J.; Woodford, N. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, 45, 645.
- [104] Simjee, S.; McDermott, P.F.; Wagner, D.D.; White, D.G. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45, 2931.
- [105] Jensen, L.B.; Hammerum, A.M.; Aarestrup, F.M.; van den Bogaard, A.E.; Stobberingh, E.E. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, 42, 3330.
- [106] Dutta, G.N.; Devriese, L.A. *Ann. Microbiol.*, 1981, 132A, 51.
- [107] Dutta, G.N.; Devriese, L.A. *J. Appl. Bacteriol.*, 1981, 51, 283.
- [108] Devriese, L.A.; Gutta, G.N. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 1984, 7, 49.
- [109] Devriese, L.A. *Ann. Microbiol.*, 1980, 131B, 261.
- [110] Dutta, G.N.; Devriese, L.A. *J. Appl. Bacteriol.*, 1981, 51, 283.
- [111] Onan, L.J.; LaPara, T.M. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003, 220, 15.
- [112] Murphy, E.; Novick, R.P. *J. Bacteriol.* 1980, 141, 316.

Two Distinct Patterns of Pleural Effusions Caused by *Mycoplasma pneumoniae* Infection

To the Editors:

We read with great interest the article by Wang et al.¹ The authors reported 5 pediatric patients with radiographically diagnosed necrotizing pneumonitis with pleural effusion caused by *Mycoplasma pneumoniae*, 2 of whom had persistent radiographic abnormalities lasting for more than several months. Complete resolution of chest roentgenograms was observed in the other 3 cases. Their presentation of the cases and its diagnostic implication were clinically valuable, but they did not mention the possible pathogenic mechanism of the disease. We suppose that the radiographic features that the authors presented for the cases with persistent abnormalities strongly suggest an organizing pneumonia with massive recruitment of neutrophils in histology.

In this context, we encountered similar pediatric cases of massive pleural effusion caused by *M. pneumoniae* infection with or without persistent radiographic abnormalities.² In the initial study including a total of 10 cases, 3 cases showed persistent radiographic abnormalities of fibrotic changes in the chest roentgenogram with the presence of *M. pneumoniae* genome detected by polymerase chain reaction in their pleural fluid samples. In the other 7 cases, radiographically abnormal findings were transient. In the subsequent report of 12 cases, we examined their pleural fluid samples for cytokines and found that interleukin (IL)-18 and IL-8 were significantly elevated in the pleural fluid samples obtained from the 4 patients with persistent radiographic abnormalities when compared with those without persistent abnormalities.^{3,4}

On the basis of our findings, we strongly speculate that there are at least 2 distinct patterns of pleural effusions caused by *M. pneumoniae* infection: one type of effusion characterized by a tran-

sient chest disease, *M. pneumoniae* genome being undetectable, and with lower (but not normal) concentrations of IL-18 and IL-8 and the other type of effusion with a persistent chest disease, *M. pneumoniae* genome being detectable, and with significantly higher IL-18 and IL-8.

It is well-known that mycoplasmal cell membranes can elicit varieties of cytokine responses (for review, see Yang et al⁵), and some kinds of cytokines must play a significant role in producing the radiographic appearance of *M. pneumoniae* pneumonia not only for children but also for adults.^{6,7} *M. pneumoniae* can induce IL-18 production through the activation of macrophages, and IL-8 production can be induced either indirectly through the function of IL-18 or directly through the function of Toll-like receptors which *M. pneumoniae* can also activate. In any case, it is reasonable to assume that IL-8 plays a pivotal role in constructing "necrotizing pneumonitis" or organizing pneumonia.

M. pneumoniae pneumonia is usually a benign, self-limited disease. Clinical samples which can be obtained from patients therefore are limited for use in clinical research. If one pays, in addition to routine laboratory testings, more attention to using newer analytical methodologies in analyzing pleural fluid samples obtained from patients with *M. pneumoniae* pneumonia, more information must be obtained for further understanding of the pathogenesis of *M. pneumoniae* infection.

Mitsuo Narita, MD

Department of Pediatrics
Sapporo Tetsudo (JR) Hospital
Sapporo, Japan

Hiroshi Tanaka, MD

Third Department of Internal
Medicine
Sapporo Medical University
School of Medicine
Sapporo, Japan

REFERENCES

1. Wang RS, Wang SY, Hsieh KS, et al. Necrotizing pneumonitis caused by *Myco-*

plasma pneumoniae in pediatric patients: report of five cases and review of literature. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23:564-567.

2. Narita M, Matsuzono Y, Itakura O, Yamada S, Togashi T. Analysis of mycoplasmal pleural effusion by the polymerase chain reaction. *Arch Dis Child.* 1998;78:67-69.
3. Narita M, Tanaka H, Abe S, Yamada S, Kubota M, Togashi T. Close association between pulmonary disease manifestation in *Mycoplasma pneumoniae* infection and enhanced local production of interleukin-18 in the lung, independent of γ interferon. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000;7:909-914.
4. Narita M, Tanaka H, Yamada S, Abe S, Ariga T, Sakiyama Y. Significant role of interleukin-8 in pathogenesis of pulmonary disease due to *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8:1028-1030.
5. Yang J, Hooper WC, Phillips DJ, Talkington DF. Cytokines in *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Cytokines Growth Factors Rev.* 2004; 15:157-168.
6. Tanaka H, Koba H, Honma S, et al. Relationship between radiological pattern and cell-mediated immune response in *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Eur Respir J.* 1996;9: 669-672.
7. Tanaka H, Narita M, Teramoto S, et al. Role of interleukin-18 and T-helper type 1 cytokines in the development of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in adults. *Chest.* 2002;121:1493-1497.

Reply:

The author proposed an interesting hypothesis about the pathophysiology of pleural effusion caused by *Mycoplasma pneumoniae*. It is biologically plausible that the author proposed that the presence of *M. pneumoniae* genome might elicit stronger immunologic reaction which subsequently leads to persistent lung damage. Yet the timing of sampling might bear some relevance to whether one could detect the genome in the pleural fluid. Before one can make a statement like this, a well-designed prospective study looking into the relationship of the presence of the genome versus the immunologic reaction and outcome is mandatory.

I do agree with the author that probably there are 2 types of pleural effusion associated with *M. pneumoniae* infection. On the basis of my clinical experience, I would advocate for more clinical and immunologic study in this area.

Christine C. Chiou, MD

Veterans General Hospital
Koahsiung, Taiwan

2001年から2002年に分離された *Bordetella pertussis* の 薬剤感受性成績と分子疫学的検討

¹⁾株式会社江東微生物研究所, ²⁾東京女子医科大学感染症科, ³⁾国立療養所南福岡病院小児科,

⁴⁾株式会社日研生物医学研究所, ⁵⁾北里大学医学部感染症学講座

大塚 正之¹⁾⁶⁾ 菊池 賢²⁾⁶⁾ 岡田 賢司³⁾⁶⁾ 東出 正人¹⁾⁶⁾
春藤 和哉⁴⁾⁶⁾ 砂川 慶介⁵⁾⁶⁾ 百日咳サーベランス研究会^{*6)}

(平成 16 年 2 月 3 日受付)

(平成 16 年 3 月 1 日受理)

Key words : *Bordetella pertussis*, drug susceptibilities, Etest,
pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

要 旨

2001年から2002年の1年間に分離された26株の *Bordetella pertussis* について、EtestによるMIC測定とpulsed-field gel electrophoresis (PFGE)によるDNA解析を試みた。

erythromycin, clarithromycin, azithromycin, clindamycin, tetracycline, minocycline, sparfloxacin, ciprofloxacin, sulfamethoxazole/trimethoprim, rifampicinのMICは全て $\leq 1\mu\text{g/ml}$ と良好な抗菌活性を示し、中でもsparfloxacinのMICは0.008~0.016 $\mu\text{g/ml}$ と最も高い抗菌活性を示した。

PFGEによる分子疫学的解析の結果、DNAの電気泳動パターンにより3タイプ(タイプI:11株(42%), タイプII:14株(54%), タイプIII:1株(4%))に型別された。また、26株の遺伝子型別と患者背景、分離された地域との間に特別な傾向は認められなかった。

今回の我々の検討においてerythromycin耐性株は検出されなかったが、今後も薬剤感受性の推移やPFGEによる分子疫学的解析により継続的な調査が必要であると考えられた。

[感染症誌 78:420~427, 2004]

序 文

百日咳は百日咳菌の感染によって起こる急性呼吸器感染症¹⁾であり、特にワクチン未接種の乳幼児感染では重篤化し易く注意を要する²⁾³⁾。百日咳患者は1981年秋から導入された改良DTaPワクチンの普及に伴い激減したが、今なお、小規模な流行が本邦⁴⁾および海外でも報告されている⁵⁾⁶⁾。また、近年は成人発症事例⁷⁾、院内感染事例⁸⁾などの

報告もみられ想像以上に患者数は多いものと推定される。

百日咳治療の第一選択薬はmacrolidesであるが1994年以降erythromycin耐性株の報告⁹⁾¹⁰⁾があり、問題になりつつある。本邦における百日咳菌の臨床分離株を対象とした薬剤感受性検査の報告^{11)~13)}は少なく種々の耐性菌が増加している今日、百日咳菌の臨床分離株における薬剤感受性調査は重要である。また、分子疫学的検討はアウトブレイクを起す感染症や流行がある病原菌の解明には欠かせない手法であり、近年はMulti-locus sequence typing (MLST)¹⁴⁾なども開発され他国間

別刷請求先:(〒305-0854)つくば市上横場445-1
株式会社江東微生物研究所 大塚 正之

での病原遺伝子解析も行われている。百日咳は世界的に流行がある感染症であり流行株の分子疫学的解析は発生動向を判断する上で重要である。そこで今回我々は、臨床分離 26 株を対象に薬剤感受性試験および pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) による分子疫学的検討を行った。

材料と方法

1. 対象施設・患者背景

- ①. 全国 88 施設の小児科から成る百日咳サーベランス研究会で 2001 年 12 月から 2002 年 11 月までの 1 年間に臨床的に百日咳が疑れた患者を百日咳菌分離の対象とした。
- ②. 患者背景は培養依頼 153 件中培養陽性 26 例 (陽性率 17%) について、調査表を用いて患者年齢、性別、ワクチン接種歴、入院・外来別、末梢血白血球数およびリンパ球百分率、CRP、体温、咳の持続期間、感染経路を調査した。

2. 使用菌株・同定・培養方法

菌株は、検体 (咽頭および後鼻腔) から分離された *Bordetella pertussis* を用いマイクロバンク (アスカ純薬/東京/日本) で -80°C に保存したものを使用した。分離菌株の同定は百日咳菌検査ガイド (第 13 回日本臨床微生物学会総会ワークショップ)¹⁵⁾ によった。

B. pertussis の前培養および薬剤感受性用には Bordet-Gengou agar base (DIFCO: 日本ベクトン・ディッキンソン/東京/日本) にグリセリン 1% を加え、滅菌調整後にウマ脱繊維素血液 15% を添加したもの (以下 BG 寒天培地と略す) を使用した。薬剤感受性用培地については、中心部の厚さが 4.0 ± 0.5 mm になるように調整し、直径 150 mm の大型シャーレ (FALCON: 日本ベクトン・ディッキンソン/東京/日本) に作製し用いた。

3. 薬剤

薬剤は erythromycin (EM), clarithromycin (CAM), azithromycin (AZM), clindamycin (CLDM), tetracycline (TC), minocycline (MINO), sparfloxacin (SPFX), ciprofloxacin (CPF), quinupristin / delfopristin (QPR / DPR), sulfamethoxazole/trimethoprim (ST),

refampicin (RFP) の 11 薬剤を用いた。

4. MIC の測定

MIC の測定は Etest (AB BIODISK: アスカ純薬/東京/日本) を用い測定法は Etest technical guide¹⁶⁾ に従った。すなわち BG 寒天培地で被験菌を 35°C , 2 日間培養後, Trypticase soy broth (DIFCO) に McFarland No. 3 相当に懸濁した菌液に滅菌綿棒を浸し試験管の管壁で余分な菌液を絞りシャーレを回転 (60°) させながら 3 回 BG 寒天培地に塗布し, Etest ストリップを培地に配置した。培養は 35°C , 好気培養 (湿潤環境) で行い, 3 日間後に阻止帯の辺縁がストリップと交差する位置の目盛りを目視で判読し MIC とした。

5. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) による遺伝子解析

PFGE は Mooi ら¹⁷⁾ の方法に準拠して行った。すなわち制限酵素 *Xba* I (宝酒造/東京/日本) で DNA を消化した後、泳動用アガロースゲルには 1% アガロースゲル (PFC Agarose, BIO-RAD: 日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ/東京/日本), 泳動装置は CHEF DR II (BIO-RAD), 泳動は 0.5XTBE (BIO-RAD) を用いて 16°C , 6.0V/cm, 泳動 22 時間 (ブロック 1, 4 to 8 sec 12 hrs; ブロック 2, 8 to 50 sec 10 hrs) の条件で実施した。PFGE パターンは菌株 No. 1 を基準にタイプ別を行った。

結 果

1. 各種薬剤の MIC

Table 1 に各薬剤に対する MIC_{50} , MIC_{90} および MIC range を示した。macrolides の MIC range は EM で $0.023 \sim 0.064 \mu\text{g}/\text{ml}$, CAM で $0.032 \sim 0.047 \mu\text{g}/\text{ml}$, AZM で $0.023 \sim 0.064 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。CLDM, TC, MINO, SPFX, CPF, ST および RFP の 7 薬剤は全て $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で優れた抗菌活性を示し, 中でも SPFX は MIC_{90} が $0.016 \mu\text{g}/\text{ml}$ と最も高い発育阻止効果を示した。また, QPR/DPR の MIC range は $1.5 \sim 4 \mu\text{g}/\text{mg}$ であり MIC_{90} は $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

2. PFGE 型別および患者背景

今回分離された 26 株の PFGE パターンを Fig. 1 に系統樹解析結果を Fig. 2 に調査表の中で報告さ

れた患者背景を Table 2 に示した. DNA のバンドパターンより大きく 3 タイプに大別された. タイプ I 11 株 (42%) の平均年齢は 13 カ月, 男女比は 3:8, 平均末梢血白血球数は 20,821/ μ l, 平均リンパ球百分率は 75%, 咳の持続期間の平均は 14 日であった. タイプ II 14 株 (54%) の平均年齢は 5 カ月, 男女比は 7:7, 平均末梢血白血球数は 23,222/ μ l, 平均リンパ球百分率は 70%, 咳の持続

期間の平均は 14 日であった. タイプ III は 1 株 (4%) で年齢 1 カ月であった. CRP, 体温については I, II 型とも上昇が見られなかった. 26 名中 24 名が DTaP ワクチン歴の調査が可能であり 19 名はワクチン接種がなかった. 一方, ワクチン接種後の発症者は 5 名でその内訳はワクチン歴 1 回 3 名, ワクチン歴 2 回 1 名, ワクチン接種回数不明 1 名であった. 感染ルートが明らかな患者は 5 名で全て家族内感染であった. また, 系統樹解析結果より菌株 14/25, 3/17, 19/22, 20/21 は DNA の完全一致をみた. これらの株の感受性成績は 11 薬剤全て 2 管差以内であった. 臨床的背景との関係については地域も異なり特別な傾向は見られなかった. 今回, 分離された 26 株の依頼地域は全国におよぶが, PFGE 型別と特定の地域流行株との間に特別な傾向は認められなかった.

考 察

近年, 様々な検査法が開発され百日咳の診断率は向上したが臨床検体からの本菌の分離は難しく分離株は少ない. Lievano ら⁶⁾は New York/USA での 2 回のアウトブレイク時における診断法を比較し PCR 陽性率 34.4% (1,297/3,769), 培養陽性率 1.2% (5/415) とし培養陽性率が極めて低いと報告している.

Table 1 MIC₅₀, MIC₉₀ and MIC ranges of 11 antimicrobial agents tested by Etest

Antimicrobial agent	MIC (μ g/ml)		
	range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Erythromycin	0.023-0.064	0.032	0.032
Clarithromycin	0.032-0.047	0.047	0.047
Azithromycin	0.023-0.064	0.032	0.047
Clindamycin	0.025-0.5	0.38	0.5
Tetracycline	0.125-1	0.5	0.75
Minocycline	0.064-0.19	0.125	0.19
Sparfloxacin	0.008-0.016	0.016	0.016
Ciprofloxacin	0.016-0.032	0.023	0.023
QRP/DPR *	1.5-4	4	4
ST **	0.094-0.25	0.125	0.25
Rifampicin	0.125-0.25	0.19	0.19

* Quinupristin/dalfopristin

** Sulfamethoxazole/trimethoprim

Fig. 1 Representative PFGE results obtained for 26 clinical *B. pertussis* isolates (lanes 1 to 26) after the inclusion of 100 μ M thiourea to the electrophoresis buffer (MW = molecular weight marker, 48.5kb DNA ladders.)

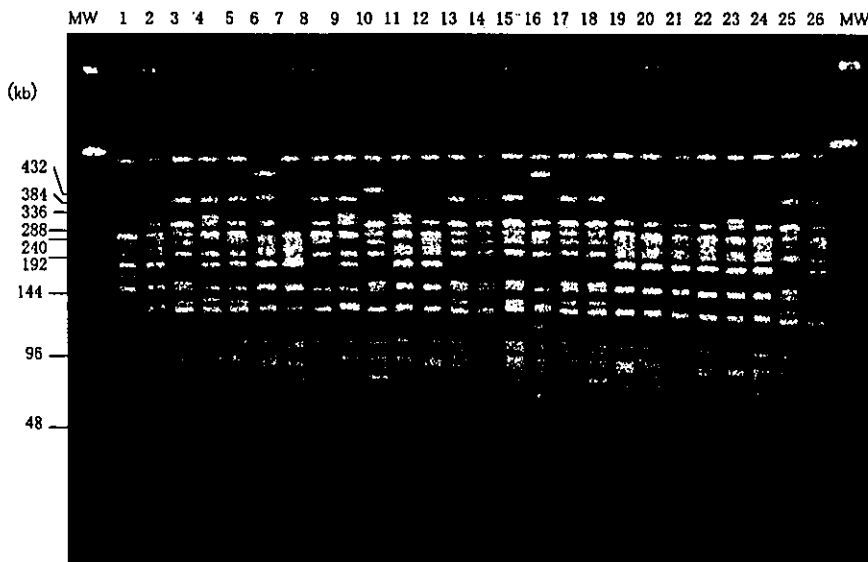
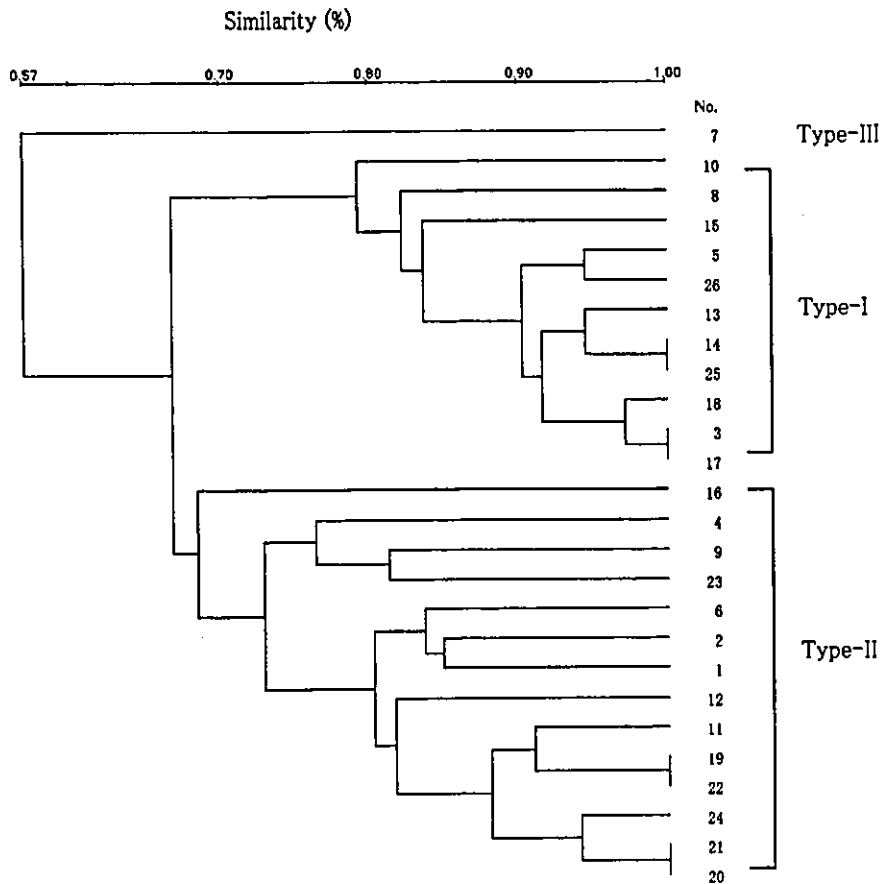


Fig. 2 Dendrogram of the cluster analysis of *Xba* I digested DNA from the strain of clinical isolation of *B. pertussis*



我が国の臨床分離株における薬剤感受性の報告は1986年の渡辺ら¹¹⁾、1995年の堀川¹²⁾らや1997年の白土ら¹³⁾の報告を含め散見されるにすぎない。*B. pertussis*のMIC測定培地にはBG寒天培地が用いられることが多いが、Hoppeら¹⁸⁾はBG寒天培地やRegan-Lowe寒天培地よりも5%ウマ血液加Mueller-Hinton寒天培地が適していると報告している。しかしながら今回我々の予備検討で5%ウマ血液加Mueller-Hinton寒天培地は菌の発育が不良であったため、BG寒天培地を使用した。

Etestは特殊な機器を必要とせず栄養要求性や培養条件の厳しい菌種に対しても簡便にMICを測定できるため、臨床現場では大変有用である。近年、Etestによる*B. pertussis*のMIC報告¹⁹⁾も見られ、再現性、信頼性が確認されている。今回の我々の検討ではEM、CAM、AZMのMICがそ

れぞれ0.023~0.064 µg/ml、0.032~0.047 µg/ml、0.023~0.064 µg/mlであり、この結果は渡辺ら¹¹⁾、堀川ら¹²⁾、白土ら¹³⁾の成績とほぼ同等でMICの大きな変動はみられなかった。海外でのHoppeら¹⁸⁾の報告はEM 0.008~0.5 µg/ml、CAM 0.008~0.12 µg/ml、AZM 0.008~0.12 µg/mlと我々の成績と比較するとやや広いMIC rangeを示したが、ほぼ同様の成績と考えられた。TC、MINO、SPFXおよびCPFXについても国内、海外のMIC値とほぼ同じ成績で差は見られなかった。

今回の感受性検討結果より我が国の*B. pertussis*の感受性成績は従来と同様にmacrolides、CLDM、TC、MINO、SPFX、CPFX、RFPおよびST合剤に対して良好な感受性を示し、米国で報告されたEM耐性株は検出されなかった。

百日咳が2~5年周期で流行する²⁰⁾理由は明らかではない。したがってPFGE型別による分子疫

Table 2 Clinical features of individual cases

No.	PFGE	Year/Month/Day	Age (Month)	Sex	State of patient	DTaP vaccination	WBC (μ l)	Lymphocyte (%)	Duration of cough (day)	CRP (mg/dl)	Temperature ($^{\circ}$ C)	Possible of infectious route	District
1	I	20010117	4M	female	inpatient	no	14,100	79	16	0.03	37.6	father	Tohoku
2	I	20010123	5M	female	inpatient	no	38,200	79	30	0.05	36.7	UK	Tyubu
3	I	20010209	12M	male	inpatient	yes two	26,200	ND	ND	< 0.3	37.3	UK	Kanto
4	I	20010417	22M	female	UK ²⁾	no	30,390	75	14	0.0	37.0	UK	Hokaidou
5	I	20010531	34M	male	UK	yes one	9,600	ND	7	0.02	37.3	UK	Kanto
6	I	20010711	7M	female	inpatient	yes one	16,200	64	ND	0.0	36.0	UK	Kanto
7	I	20010711	6M	male	UK	no	16,200	80	ND	0.0	ND	UK	Kanto
8	I	20010719	3M	female	UK	no	14,400	75	5	0.03	37.0	UK	Kinki
9	I	20010726	3M	female	inpatient	no	22,100	ND	12	0.0	37.1	grandfather	Kanto
10	I	20010805	36M	female	UK	UK	ND ³⁾	ND	ND	ND	ND	UK	Kanto
11	I	20010918	12M	female	UK	no	ND	ND	ND	ND	ND	UK	Kanto
	mean		13M	3/8 ¹⁾			20,821	75	14	0.05	37.0		
1	II	20001211	3M	female	inpatient	no	14,610	69	ND	0.1	ND	UK	Kanto
2	II	20010115	9M	male	inpatient	no	16,800	64	ND	0.1	37.4	family	Kanto
3	II	20010117	6M	male	inpatient	no	31,200	ND	10	0.24	38.0	UK	Tohoku
4	II	20010126	12M	female	UK	no	20,170	60	14	0.3	36.5	UK	Kanto
5	II	20010302	4M	male	inpatient	no	50,500	75	14	0.0	37.0	UK	Kanto
6	II	20010502	6M	female	UK	no	27,600	ND	ND	ND	ND	family	Kinki
7	II	20010520	4M	female	inpatient	no	13,500	ND	10	0.0	36.0	UK	Kanto
8	II	20010717	11M	male	UK	yes UK	6,700	70	ND	0.2	36.7	UK	Kanto
9	II	20010907	11M	male	outpatient	yes one	29,300	82	21	0.0	36.8	UK	Kanto
10	II	20010913	2M	female	inpatient	UK	21,200	75	ND	0.25	ND	UK	Kanto
11	II	20010919	4M	female	outpatient	no	35,400	ND	14	ND	37.2	family	Tyugoku
12	II	20011025	1M	male	inpatient	no	10,000	69	7	0.0	36.0	UK	Kanto
13	II	20011105	1M	female	inpatient	no	24,900	69	20	< 0.2	38.0	UK	Tyugoku
14	II	20010523	1M	male	UK	no	ND	ND	ND	ND	ND	UK	Kyusyu
	mean		5M	7/7			23,222	70	14	0.12	36.9		
1	III	20010126	1M	male	UK	no	ND	ND	ND	ND	36.9	UK	Hokaidou
	mean		1M	1/0							36.9		
Total			85M \pm 9	11/15			22,239 \pm 10,435	72 \pm 6	14 \pm 6	0.09 \pm 0.1	36.9 \pm 0.5		
mean \pm SD													

¹⁾ male/female.²⁾ ND : not done.³⁾ UK : unknown.

学的解析や患者背景を綿密に調査検討し、その流行タイプや感染要因を明らかにしていくことは重要で意味のあることと考える。Weberら²¹⁾はフランスで分離された878株の遺伝子解析の結果、特定DNAタイプの増加を報告している。また、Moissacら²²⁾も1989年から1991年にAlberta/Canadaで起こったアウトブレイクにおいて分離された70株について、PFGEを実施し感染源の特定を試みている。今回のPFGEパターン結果よりII型が54%と半数以上を占め白血球数、患者年齢でI型と若干違いがみられたが株数が少なく本邦における流行株の地域差や病原性を解明するには至らなかった。しかし、今後も百日咳菌の薬剤感受性の推移や分子疫学的動向を継続して調査していく必要があると考えられた。近年、MLSTなどの手法を用いて種々の病原菌の国際間における分子疫学的検討が盛んになってきている¹⁴⁾。百日咳についても今後PFGEに加えこのような手法を用いて世界レベルで流行株の研究やワクチンの有効性に関する情報を共有することが必要と考えられた。

謝辞：稿を終えるにあたりPFGE型別を実施して頂きました国立感染症研究所細菌第2部・蒲地一成先生に深謝致します。

※研究会参加施設

<北海道>旭川医科大学小児科(室野晃一)・旭川厚生病院(坂田宏)・札幌医科大学医学部小児学教室(堤裕幸, 木下和子)・札幌社会保健総合病院小児科(宇加江進)・札幌鉄道病院小児科(平賀洋明, 成田光生)・総合病院北見赤十字病院(渡智久)・名寄市立総合病院小児科(滝本昌俊, 室野晃一, 佐藤幸幸)・北海道小児総合保健センター小児科(皆川公夫, 今野俊一)・美唄病院(佐々木雅一)

<青森>黒石市国民健康保健黒石病院(青山隆蔵)・弘前市立病院小児科(葛西幹雄)

<宮城>東北労災病院小児科(遠藤廣子, 高柳玲子, 沼田美香)

<秋田>大館市立総合病院小児科(高橋義博, 遠野千佳子, 遠藤泰史, 太田和子, 小松和子, 和田忠士)

<山形>勝島小児科(勝島矩子), 横山小児科(横山新吉)

<福島>福島県立会津総合病院(酒井英明, 青木富美男)・福島県立医科大学医学部小児科(鈴木仁, 鈴木順造)

<群馬>希望の家療育病院(町田祐一, 田中宏子)・桐生厚生総合病院小児科(桑島信)・総合太田病院小児科(佐藤吉壮)

<埼玉>越谷市民病院(山本勉, 五十里博美)・埼玉医科大学小児科(佐々木望, 山崎勉, 上原すゝ子)・みさと健和病院小児科(長谷川裕美)

<千葉>君津中央病院小児科(田島和幸, 森淳夫)・千葉市立海浜病院小児科(黒崎知道)・千葉大学医学部小児科(黒木春郎, 石和田稔彦)・まなこどもクリニック(原木真名)・めぐろクリニック(目黒英典)

<東京>医療法人社団松緑会永寿堂医院(松永貞一)・国立病院東京医療センター小児科(岩田敏)・小城医院(小城崇弘)・昭和大学医学部小児科(飯倉洋治, 辻祐一郎)・聖路加国際病院小児科(細谷亮太, 稲井郁子)・田園調布中央病院(岡秀)・同愛記念病院小児科(青木國輝)・東京女子医科大学附属第二病院小児科(鈴木葉子)・東京通信病院小児科(保科清)・東京都立駒込病院(高山直秀)・東京都立清瀬小児病院新生児科(磯畑栄一)・博慈会記念総合病院(田島剛, 中山栄一)・慶應義塾大学医学部附属病院小児科(新庄正宣, 関口進一郎)

<神奈川>あざがみ小児科クリニック(阿座上志郎)・伊勢原協同病院小児科(木村和弘, 山本敬一)・川崎市立川崎病院小児科(長秀男, 中尾歩)・けいゆう病院小児科(木村恭子)・慈啓会大口東総合病院小児科(新納憲司, 高橋礼子, 吉野谷友香)・昭和大学藤が丘病院小児科(山田耕一郎, 池田祐一)・高宮小児科(高宮光)・帝京大学医学部附属溝口病院小児科(新保敏和, 石黒精)・平塚市民病院小児科(山田健一朗)

<新潟>佐渡総合病院小児科(岡崎実)

<福井>福井県立病院小児科(春木伸一)

<山梨>井上内科小児科医院(井上利男)・山梨赤十字病院小児科(豊永義清, 佐野正昭, 古市嘉行)

<岐阜>厚生連揖斐総合病院(日江井邦彦, 後藤加寿美)

<静岡>瀬名こどもクリニック(望月康弘)・袋井市民病院小児科(中島俊彦, 上村桂一)

<愛知>名鉄病院小児科(岩井直一)

<三重>国立療養所三重病院小児科(庵原俊昭, 中野貴司)

<大阪>PL病院小児科(加藤伴親)・大阪市立総合医療センター小児救急科(塩見正司, 外山正生)・大阪労災病院小児科(川村尚久)・森川こどもクリニック(森川嘉郎)

<兵庫>神戸市立中央市民病院小児科(春田恒和)

平成16年5月20日

- <和歌山>こばやし小児科 (小林昌和)
- <岡山>川崎医科大学小児科 (寺田喜平)・川崎医科大学小児科2講座 (尾内一信, 川崎浩三, 古村速, 竹川剛史, 福永真之介)・岡山医療センター (金谷誠久, 永礼旬)・岡山赤十字病院小児科 (国富泰二)
- <広島>県立広島病院小児科 (坂野堯)
- <山口>社会保険徳山中央病院小児科 (内田正志)・山口県立中央病院小児科 (村野一郎, 吉井英樹, 杉尾陽子)・山口赤十字病院 (山村泰一, 大淵典子)
- <香川>国立療養所香川病院小児科 (岡田隆滋, 篠原ゆかり)
- <高知>高知医科大学小児科 (脇口宏, 前田明彦, 友田隆士)
- <福岡>久留米大学医学部小児科 (津村直幹, 長井健祐, 大津寧, 升永憲治)・社会保険田川病院小児科 (佐々木宏和)・福岡市立こども病院・感染症センター (青木知信, 水野由美, 江口克彦, 渡辺高貴)・福岡大学医学部小児科学教室 (山口覚, 田中美紀)
- <佐賀>国立療養所東佐賀病院小児科 (下山孝俊, 富永薫)・やまだ小児科クリニック (山田秀二)
- <長崎>対馬いづはら病院 (沖眞一郎)
- <熊本>しまだ小児科 (島田康)
- <大分>医療法人松本小児科 (松本重孝)
- <沖縄>沖縄県立那覇病院小児科 (安慶田英樹)

文 献

- 1) Scott A. Halperin : 百日咳および他の *Bordetella* 感染症. ハリソン内科学, 株式会社メディカル・サイエンス・インターナショナル, 2003 ; p. 983—7.
- 2) 加藤達夫, 徳竹忠臣, 松宮千春, 本庄綾子 : 第二種伝染病と危機管理—百日咳—. 臨床と微生物 2002 ; 29 : 473—6.
- 3) 岡田賢司 : 百日咳. 開業医の外来小児科学, 南山堂, 2002 ; 4 : p. 200—7.
- 4) 大塚正之, 浦山 修, 東出正人 : 百日咳の新潟地域における流行. 日本臨床微生物学雑誌 2002 ; 4 : 229—32.
- 5) KK Hardin, K Burnette, C Lohff, A Houston : Iowa *Bordetella pertussis* trend data—1991—2001. In program and abstracts of the 103rd General Meeting. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 2003 ; abstr. Y-014 : p. 93.
- 6) Fabio A Lievano, Meredith A Reynolds, Alfred L Waring, Joel Ackelsberg, Kristine M Bisgard, Gary N Sanden, *et al.* : Issues associated with and recommendation for using PCR to detect outbreaks of pertussis. J Clin Microbiol 2002 ; 40 :

- 2801—5.
- 7) Chrry JD : The role of *Bordetella pertussis* infections in adults in epidemiology of pertussis. Dev Biol Stand 1997 ; 89 : 181—6.
- 8) 狩野孝之, 大崎幸七, 中野英二, 沖本二郎 : 重症心身障害児・者病棟で発生した百日咳集団感染についての検討. 感染症学雑誌 2001 ; 75 : 916—22.
- 9) KE Wilson, PK Cassiday, T Popovic, GN Sanden : *Bordetella pertussis* isolates with a heterogeneous phenotype for erythromycin resistance. J Clin Microbiol 2002 ; 40 : 2942—4.
- 10) E Kent korgenski, Judy A Daly : Surveillance and detection of erythromycin resistance in *Bordetella pertussis* isolates recovered from a pediatric population in the intermountain west region of the United States. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 2989—91.
- 11) 渡辺 満, 原口怡子, 権田隆明, 青山辰夫, 小沢広子, 村瀬雄二, 他 : 1975年から1985年にかけて分離した百日せき菌およびパラ百日せき菌の血清型別ならびに薬剤感受性. 感染症誌 1987 ; 61 : 79—86.
- 12) 堀川和美, 岡田賢司, 石橋哲也, 村上光一, 大淵典子, 植田浩司 : 福岡における百日咳の流行 : 分離状況およびMIC分布 (1990—1993). 感染症誌 1995 ; 69 : 878—83.
- 13) 白土佳子, 橋口佳代子, 高木妙子, 秋田博伸 : 1989年から1996年にかけて分離された百日咳菌の血清型と薬剤感受性. 日本臨床微生物学雑誌 1997 ; 7 : 205—9.
- 14) Rachel Urwin, Martin CJ Maiden : Multi-locus sequence typing : a tool for global epidemiology. Trends in Microbiol 2003 ; 11 : 479—87.
- 15) 三澤成毅, 打田孝枝, 川村千鶴子, 郡 美夫, 霜島正治, 高市文佳, 他 : 2002. 百日咳菌検査ガイド. 第13回日本臨床微生物学会総会ワークショップ p. 86—106.
- 16) AB BIODISK : Etest technical guide 1—13 1997.
- 17) Mooi FR, Hallander H, Wirsing von Konig CH, Hoet B, Guiso N : Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates : recommendations for a standard methodology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000 ; 19 : 174—81.
- 18) Hoppe JE : State of art in antimicrobial susceptibility of *Bordetella pertussis* and antibiotic treatment of pertussis. Infection 1998 ; 26 : 242—6.
- 19) C Wirsing V Konig, M Riffelmann, C Vahrenholz : Antimicrobial sensitivities as measured by Etest among *Bordetella pertussis* isolates in Germany. In program and abstracts of the 103rd General Meeting. American Society for Microbiol

- ogy, Washington, D.C. 2003 ; abstr. C-081 : p. 75.
- 20) 横浜市衛生研究所：感染症・疫学情報課ホームページ, 百日咳について. <http://www.eiken.city.yokohama.jp/infection-inf/whoop1.htm>.
- 21) Christian Weber, Caroline Boursaux-eude, Gilberte Coralie, Valerie caro, Nicole GuisoLynne : Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 year in France, where a single effective Whole-Cell Vaccine has been used for more than 30 years. J Clin Microbiol 2001 ; 39 : 4396—403.
- 22) Yvon R Moissac, Shery L Ronald, Mark S Peppler : Use of pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological Study of *Bordetella pertussis* in a whooping cough outbreak. J Clin Microbiol 1994 ; 32 : 398—402.

Susceptibility Testing and Molecular Epidemiology of Clinical Strains of
Bordetella pertussis Isolated in Japan from 2001 to 2002

Masayuki OHTSUKA¹⁾⁶⁾, Ken KIKUCHI²⁾⁶⁾, Kenji OKADA³⁾⁶⁾, Masato HIGASHIDE¹⁾⁶⁾,
Kazuya SHUNDO⁴⁾⁶⁾, Keisuke SUNAKAWA⁵⁾⁶⁾ & Japanese Pertussis Surveillance Group^{*6)}

¹⁾Kotobiken Medical Laboratories Inc.

²⁾Department of Infectious Disease Tokyo Women's Medical University

³⁾Department of Pediatrics National-Minami Fukuoka Chest Hospital

⁴⁾Nikken Bio Laboratories Inc.

⁵⁾Department of Infectious Disease Kitasato University School of Medicine

We determined antimicrobial susceptibilities and analyzed molecular epidemiology of 26 strains of *Bordetella pertussis* clinically isolated and then performed pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in Japan (Japanese Pertussis Surveillance Group Participants), from 2001 to 2002.

The MICs of erythromycin, clindamycin, tetracyclines, fluoroquinorones, trimethoprim-sulfamethoxazole and rifampicin of all isolates against these showed 1 µg/ml or less. Sparfloxacin is the most potent agent, of which the MICs showed 0.008–0.016 µg/ml.

Results of DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) differentiated three types (Type I ; 11 strains (42%), type II ; 14 strains (54%) and type III ; 1 strains (4%)). However, no relation between regions and identical PFGE patterns was found in this study.

Further, surveillance of the antimicrobial susceptibilities and molecular epidemiology of *B. pertussis* will be required.



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の問題点

成田 光生*

要 旨

2000年から2003年までに肺炎患者から得られた肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) 野生株の性状解析の結果、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。23SリボソームRNAドメインVにおける遺伝子変異の検索による内訳は、A2063Gが10株、A2063C、A2064G、C2617Gが各1株であった。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いる。現時点では耐性菌感染による肺炎が、感受性菌によるそれと比較して必ずしも重症化する傾向は認められていないが、今後その増加による臨床への影響が危惧される。

はじめに

近年、治療に苦慮した臨床的印象から、薬剤耐性の *Mycoplasma pneumoniae* (マイコプラズマ) による感染が疑われた肺炎の発生が全国各地から報告されている。この点に関し筆者らは2000年札幌市において、臨床的に薬剤耐性が疑われた肺炎患者5例からマイコプラズマを分離し、性状解析を行った。その結果1例において、実際にマクロライド耐性菌による感染であったことを証明したり¹⁾、一方で、本例を含めその後経験された4例の耐性菌感染が証明された肺炎患者においては、臨床的にはマクロライドが奏効していたという印象がある²⁾。

現在日本でどのような耐性菌がどの程度の頻度で出現しているのか、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の問題点について述べる。

I. マクロライド耐性マイコプラズマ解析法

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、自家製のマイコプラズマ専用培地 (PPLO培地) を用いて行った。

マイコプラズマの薬剤感受性検査としては、分離株を神奈川県衛生研究所に送付し、微量液体培地希釈法 (マイクロプレート法) を用いて、最小発育阻止濃度 (MIC; $\mu\text{g/ml}$) を測定した³⁾。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、ロキシスロマイシン、オレアンドマイシン、15員環マクロライドとしてアジスロマイシン、16員環マクロライドとしてジョサマイシン、ロキタマイシン、スピラマイシン、ミデカマイシン、

* Mitsuo NARITA 札幌鉄道病院小児科

[連絡先] ☎ 060-0033 北海道札幌市中央区北3条東1丁目 札幌鉄道病院小児科

キタマイシン, 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, リンコマイシン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ルフロキサシン, パズフロキサシン, レボフロキサシン, 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, ガチフロキサシンを用いた。

23 S リボソーム (r) RNA ドメイン V における遺伝子変異の検索は, PCR-直接塩基配列決定法を用いた。分離株のうち単一コロニーを純培養し, 熱処理により DNA を抽出した。はじめにドメイン V の広い領域を増幅し, 次に 2063 と 2064 番目のアデニンを含む領域および 2617 番目のシトシ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。

II. 現在の日本の実状

薬剤感受性試験の結果, 2000 年から 2003 年まで筆者らの研究関連施設で分離の野生株においては, 札幌では 15 株中 2 株 (13.3%), 北海道池田町では 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 (耐性化) が認められた (表 1)。23 SrRNA ドメイン V における遺伝子配列検索の結果, その内訳は, 2063 番目のアデニンがグアニンに置換したものの (A 2063 G と表記, 以下同様) が 10 株, A 2063 C, A 2064 G, C 2617 G が各 1 株であった (図, 2063, 2064, 2617 はそれぞれ大腸菌における 2058, 2059, 2611 に相当)。このようにマクロライド耐性マイコプラズマは日本各地から分離されており, この結果は現在の日本における実状を反映していると考えられる。

薬剤耐性マイコプラズマは決してまれなものではなく, 普遍的に野生に存在していることを

表 1 2003 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)
A 2063 G	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)
A 2063 C	1	11	9%	北海道池田町 (2002)
A 2064 G	1	44	2%	神奈川県衛研 (2003)
C 2617 G	1	11	9%	北海道池田町 (2002)

マイコプラズマにおける 23 SrRNA ドメイン 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 に相当する。耐性株の出現頻度は総数で 17.1%。

示唆している。この点, 1983~98 年の間 (99 年は分離株なし) に神奈川県衛生研究所にて検索された野生株 296 株のうちには耐性菌は 1 株も存在していなかったことから (岡崎則男, 私信), この耐性化は 2000 年以後急速に進行したものと推測される。この理由については不明である。また野生株において A 2063 G が圧倒的に多い理由としては, A 2063 G がもっと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もっとも増殖力が強く, 伝播しやすいことが推測される。

III. マクロライド耐性マイコプラズマの性状

遺伝子変異の種類から薬剤感受性試験の結果をみると, A 2063 G 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 (検索したいずれの薬剤に対しても MIC が最低希釈濃度以上) であったが, 16 員環マクロライドにおける結果は薬剤により, あるいは株によりばらつきがあり, 一定の傾向が認められなかった (表 2)。A 2063 C および A 2064 G の変異 (各 1 株) では 14 から 16 員環すべてのマクロライドに高度耐性であった。C 2617 G では

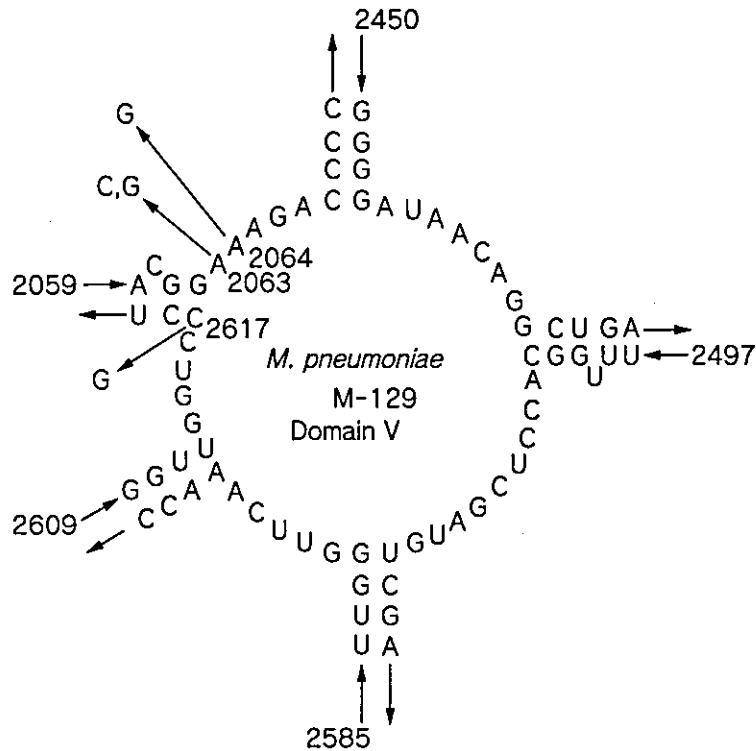


図 マイコプラズマにおける 23 SrRNA ドメイン V の変異部位と塩基置換

2063, 2064, 2617 は大腸菌における 2058, 2059, 2611 に相当する。

表 2 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	A 2063 G (n=10)	A 2063 C	A 2064 G	C 2617 G	標準株 (M 129)
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 ($\mu\text{g}/\text{ml}$).

*2: EM; エリスロマイシン, CAM; クラリスロマイシン, RXM; ロキシスロマイシン, OL; オレアンドマイシン, AZM; アジスロマイシン, JM; ジョサマイシン, RKM; ロキタマイシン, SPM; スピラマイシン, MDM; ミデカマイシン, 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. () 内はマクロライドの員環数.

14, 15員環マクロライドでは薬剤によりMICは大きなばらつきがみられ, 16員環マクロライドについてはMICのわずかな上昇は認められるもののおおむね感受性という結果であった。

マクロライド以外の薬剤では, 標準株のMIC値(表2)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, 結果は示していないがニューキノロン系の抗菌剤ではレボフロキサシン, 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感受性²⁾と考えられる結果であった。

IV. マクロライド耐性化の分子機構⁴⁾

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サブユニットのなかでアミノ酸がつながれポリペプチドが合成されていくが, この際重要な働きをするのが23SrRNAである。その中心がドメインVで, マクロライドはこのドメイン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。

このマクロライドがドメイン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(図)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ドはドメインVに結合できず, すなわち蛋白合成を阻害できず, その菌は完全に耐性化する。またドメインVはループ状の構造をとっているが, このループを閉じる役割をしているのが2062番目のグアニンと2617番目のシトシン(図)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, すなわちマクロライドがドメイン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。

V. マクロライド耐性マイコプラズマの耐性化機構

マクロライド耐性化のメカニズムとしては, 抗生剤のpressureによるselectionの結果と考えるのが自然である。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³⁾⁵⁾, 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うること⁶⁾⁷⁾が知られている。抗生剤により治療され臨床的には治癒した患者のなかで実際には耐性菌が出現しており, 周囲に排泄され, 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, 上述のごとく23SrRNAドメイン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菌に伝播されることはなく, またマクロライド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ないものと考えられる。

VI. マクロライド耐性マイコプラズマ感染症の臨床症状

筆者を含め, マクロライド耐性が証明されたマイコプラズマ感染による肺炎患者を治療した経験をもつ臨床医は決して多くない。その限られた経験のなかでまず印象としてあげられるこ

表3 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）	小児の適応	剤 型		
				錠	散	注射
ミノサイクリン	有	無（有）	有	○	○	○
シプロフロキサシン	有	無（有）	無	○	○	○
ガチフロキサシン, スパルフロキサシン	有	有	無	○	×	×
レボフロキサシン	有	無（有）	無	○	○	×
トスフロキサシン	有	無（有）	無	○	×	×

「適応」は保険適応を意味する。マクロライドが有する免疫修飾作用は考慮していない。

とは、耐性菌による肺炎が必ずしも難治性ではなく、少なくとも感受性菌による治療遅延例とは判別できない程度か¹⁾、むしろマクロライド投与により速やかに解熱している場合も多いことである²⁾。おそらく一般的には多くの場合、実際に株が分離されて薬剤感受性が決定しなければ、耐性菌感染とは気づかれないうちに治癒しているものと想像される。

この理由として筆者は、マクロライドの免疫修飾作用（サイトカイン産生抑制作用）がマイコプラズマ肺炎の治療効果として機能しているのではないかと考えているが²⁾、いまだ推論の域は出ていない。今後症例を蓄積しての検討課題である。一方小児科領域で多い髄膜脳炎などのマイコプラズマ感染による肺外発症については、幸い現在のところ耐性菌による感染が証明された報告はなく、その重症度については不明である。

VII. マクロライド耐性マイコプラズマ感染症の診断

臨床にかか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、培養法ではそれが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増幅と制限酵素切断による耐性遺伝子迅速診断の可能性につき、国立感染症研究所にて現在、検討中である³⁾。

実際、現時点までの保存試料を用いた研究結果においては、PCR法によると2000年以後に関東圏で流行したマイコプラズマの20%以上が耐性変異（すべてA2063G）を有していたというデータも得られている（詳細未公表）。分離培養による耐性菌比率は17%であったが、耐性菌は感受性菌と比較するとやや分離し難い印象があり、培養が成功せずに脱落していることも考えられ、遺伝子検出による比率（20%以上）のほうがより実状に近い可能性がある。

VIII. マクロライド耐性マイコプラズマ感染症の治療

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効した印象がもたれる場合がある。

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、やはり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3にまとめた。耐性菌の感受性、服薬可能性、疾患としての保険適応などについて成人では問題ないが、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ない。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あるシプロフロキサシン、散剤のあるレボ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。

おわりに

以上述べたごとく、現在の日本では少なく見積もってもマイコプラズマ野生株の17%、およそ6株に1株はマクロライド耐性菌であり、この数字には大きな地域差はないものと考えられる。しかしながら日常診療上、そのような数字は実感されていないものと思われる。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が奏効して治癒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。これを自然経過というのは簡単であるが、そうなるとマイコプラズマ肺炎の少なからぬ症例は、そもそも自然経過で治っているということになる。これはやはりマイコプラズマ肺炎には確かにマクロライドが効いている、という経験的印象に反するものである。

そこでマクロライドの治療効果を考えた場合、今後の研究としては、まずマクロライドはマイコプラズマ肺炎に臨床的に効いているということ的前提にして、その効果が感受性菌による感染と耐性菌による感染の間で実際に差がないのか否かを検証し、もし有意な差がないとすればその理由は何かと研究を進めることが今

後とるべき方向性であると考えられる。

本稿で述べたマクロライド耐性マイコプラズマの研究結果は、とんでん小児科(札幌)山田 諭、池田町立病院(北海道)小児科原田正平、神奈川衛研・微生物部・呼吸器系細菌岡崎則男、大屋日登美、国立感染研・細菌第2部・第2室佐々木次雄、見理 剛、久保田真由美、諸氏の多大なご努力の成果であり、心より感謝の意を表する。

文 献

- 1) 成田光生ほか：肺炎マイコプラズマ感染症における臨床的クリンダマイシン耐性について。臨床小児医学 48：123-127, 2000
- 2) 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。医学のあゆみ 209：545-549, 2004
- 3) Okazaki N et al：Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin *in vitro*. Microbiol Immunol 45：617-620, 2001
- 4) Vester B, Douthwaite S：Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23 S rRNA. Antimicrob Agents Chemother 45：1-12, 2001
- 5) Lucier TS et al：Transition mutations in the 23 S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 39：2770-2773, 1995
- 6) Smith CB et al：Shedding of *Mycoplasma pneumoniae* after tetracycline and erythromycin therapy. N Engl J Med 276：1172-1175, 1967
- 7) Niitu Y et al：Resistance of *Mycoplasma pneumoniae* to erythromycin and other antibiotics. J Pediatr 76：438-443, 1970
- 8) Matsuoka M et al：Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. Antimicrob Agents Chemother, 2004 (in press)

<病態の理解から診断・治療へ>

マイコプラズマ脳炎

成田光生*

Mitsuo Narita

はじめに

Mycoplasma pneumoniae (以下、マイコプラズマ) 感染症に伴い脳炎が発症する場合のあることは、小児科領域ではよく知られている。麻疹や水痘と異なり特徴的な身体所見がないことから臨床診断が難しく、正確な頻度を算出するのは困難であるが、入院を要し血清学的にマイコプラズマ感染症が証明された患者の4.8%に中枢神経症状が認められたとする報告がある¹⁾。また、感染性脳炎の中では13.1%を占め、麻疹、水痘などと並んで最も頻度の高い感染症のひとつであったという報告もある²⁾。いずれにせよ決してまれなものではない。ただし、臨床医学的方法論に限られていることや適切な実験動物系がないことなどから、その病態・発症機構に関してはほとんどわかっていない。本稿では、現在までの筆者らの経験をもとに、マイコプラズマ脳炎に関する病態、診断、治療を述べる。

1. 病因, 病態

マイコプラズマ感染に伴う中枢神経系病変はいわゆる白質脳炎、脳幹脳炎、脊髄炎など解剖学的にさまざまな部位に、単独にあるいは同時に認められる^{1,3)}。また、ギラン-バレー症候群のように明らかに免疫学的機序が推測される病型が存在する一方で、脳脊髄液からマイコプラズマ自体が分離される例も確実に存在する。以上のことなどから、その発症機序が一元的に説明できるものでないこ

とは、古くから一般的に認められている。

筆者らはマイコプラズマ感染症で中枢神経系症状を発症した患者の脳脊髄液を用いてマイコプラズマ DNA の存在を PCR 法で解析した⁴⁾。その結果、37.5°C以上の発熱から7日以内に中枢神経系症状を発症した例では、8日以後に発症した例と比較して脳脊髄液中マイコプラズマゲノムの陽性率が有意に高かったことから、これら2群ではその発症機序にも何らかの差異があるのではないかと考え、前者を早発性脳炎、後者を遅発性脳炎として分類しうる可能性を発表した^{5,6)}。この現象は国内外の複数の研究施設からの培養法を含めた解析にても実証され^{7,8)}、一つの知見として認知されている。この点、早発性脳炎では炎症部位に菌体自体の存在が必要条件である直接型の機序が、遅発性脳炎では炎症部位には必ずしも菌体自体が存在しない間接型の機序が推測される。

また一般的に、マイコプラズマ感染症を疑うきっかけとされている肺炎との関連でひとつ注意すべき点として、脳炎では必ずしも肺炎を伴っていないことが以前からも指摘されており^{1,3)}、近年の報告もそれを裏づけている^{6,7)}。この点、筆者はPCR法による検索にて、肺炎が認められない場合のほうが、マイコプラズマゲノムが血中に存在する場合の多いことを報告した⁹⁾。肺炎という局所での免疫応答を受けない場合のほうがマイコプラズマはむしろ血中に進入しやすく、時として脳炎(とりわけ早発性脳炎)を発症する要因となっているのではないかと考えられる。

一方で、マイコプラズマ自体には活性化酸素を産生する以外には直接の細胞障害性はなく、疾患を発症するためには宿主との何らかの interaction

* 札幌鉄道病院小児科

(〒060-0033 札幌市中央区北3条東1丁目)

TEL 011-241-4971 FAX 011-222-9260

表 1 サイトカインおよび抗 Gal-C 抗体 ELISA キットの特性と生理的範囲

	製造元	検出限界 (pg/ml)	生理的範囲 (pg/ml)
IL-6	富士レビオ (日本)	2.5	<10.0
IL-8	アマシャム (英国)	5.0	<10.0
IL-18	MBL (日本)	12.5	<260
IFN- γ	アマシャム	0.1	<1.5
TNF- α	アマシャム	4.5	<7.5
Gal-C, IgM, IgG	Nishimura ら ¹⁰⁾		初希釈以下

Gal-C: ガラクトセレブロシド

抗 Gal-C 抗体は IgM, IgG いずれも血清が初希釈 160 倍, 脳脊髄液が初希釈 4 倍

生理的範囲に関しては主に血清を対象とした製造元の推奨あるいは筆者自身のデータにもとづくものであり, それが脳脊髄液についても妥当であるかは不確定要素も多く, あくまで参考値として示す。

が必要なことも古くから推測されてきた。1 例として, マイコプラズマの膜成分とヒト赤血球の膜成分 (I 抗原) が交差抗原性を有することが明らかにされ, 自己免疫性溶血性貧血 (寒冷凝集素症) の原因と考えられている。また近年, マイコプラズマの細胞膜には炎症性サイトカイン産生を誘導する作用のあることが明らかにされている。これらのことを考え合わせると, 早発性脳炎=直接型の機序は中枢神経局所におけるマイコプラズマ膜成分による炎症性サイトカイン産生誘導を介しての組織障害であり, 遅発性脳炎=間接型の機序は呼吸器粘膜で増殖したマイコプラズマ膜成分と神経系細胞との交差抗原性を介しての組織障害ではないかとの推論が成り立つ。そこでこの早発性脳炎と遅発性脳炎の機序を探る目的で, 脳脊髄液および血清中の各種サイトカインおよび抗ガラクトセレブロシド (Gal-C) 抗体の存在 (神戸市垂水区保健部・黒木茂一先生のご好意による) を検討した (表 1)。

病的意義において重要と考えられる脳脊髄液を用いての検討結果を表 2 に示した。IL-6, IL-8 はどの病型においても上昇しており, IFN- γ , TNF- α は全く関与していなかった。IL-18 の遅発性脳炎での上昇がやや特徴的であった。抗 Gal-C IgM 抗体は一部の症例で検出された。このうち IL-6 の上昇は非特異的な炎症の結果と考えられる。IL-8 はマイコプラズマ感染以外にも, ウイルス性あるい

表 2 脳脊髄液中サイトカインおよび抗 Gal-C 抗体測定の結果

	早発性脳炎 (9 例)	遅発性脳炎 (4 例)	無熱性脳炎 (3 例)	無菌性髄膜炎 (3 例)
IL-6	5/8	2/3	1/3	3/3
IL-8	6/7	3/4	2/3	3/3
IL-18	1/8	4/4	1/3	0/3
IFN- γ	0/8	0/4	0/3	0/3
TNF- α	0/9	0/4	0/3	0/3
Gal-C IgM	2/7	1/3	0/3	0/3
IgG	0/7	0/3	0/3	0/3

Gal-C: ガラクトセレブロシド

早発性脳炎: 37.5°C 以上の発熱から 7 日以内に中枢神経系症状を発症した例

遅発性脳炎: 同上, 8 日以後に発症した例

生理的範囲をこえた例数/検討例数を示した。

は細菌性中枢神経系感染症においても脳脊髄液中で上昇することが報告されており, 中枢神経系内に炎症性細胞を動員することで発症機構に関与していることが推測される。IL-18 は中枢神経系に関してはマウスの実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症に関与していることが報告されており, マイコプラズマ脳炎の発症機構と関連している可能性はある。抗 Gal-C IgM 抗体に関しては, 神経細胞のミエリンに存在する Gal-C とマイコプラズマ菌体の膜成分に存在する糖脂質が免疫学的に交叉することは証明されている。今回脳脊髄液中において本抗体が存在する例のあることが証明されたのは, 発症機構との関連で注目される¹¹⁾。ただしまだ例数も少なく, 筆者らが検索した範囲では, 発症が早発性か遅発性か, あるいは病変が限局性か広範かなど, 臨床病型と対応して特異的に発症に関与していると考えられる因子は見出せなかった。

II. 病態からみた症候, 検査所見, 診断

マイコプラズマ脳炎に特徴的な症候はなく, 他の一般の脳炎と変わるところはない。

診断も一般のマイコプラズマ感染症と変わるところはなく, 確定診断はペア血清を用いた血清学的診断に頼らざるをえない。なお, 基本的に血清抗体価の高低は脳炎の重症度とは関係ない³⁾。また, 脳脊髄液中のマイコプラズマ抗体の意義であ

るが、たしかに脳炎患者においてマイコプラズマ抗体の髄腔内産生を証明した報告はある。ただ、筆者らを含め多くの検討においては、脳脊髄液マイコプラズマ抗体の高低と臨床病型あるいは臨床的重症度との間に関連は認められていない。脳脊髄液抗体の大部分はおそらく、血清抗体の濃度と血液脳関門損傷の程度に依存する受動的なもので、病的意義は少ないと考えられる。

PCR法による早期診断の可能性であるが、上述のように早発性脳炎においては直接型の機序も考えられ、病初期に得られた脳脊髄液を用いたPCRにより早期診断しうる可能性はある。一方、遅発性脳炎ではそもそも菌体自体が存在していない可能性が高く、脳脊髄液を検索しても診断は難しいものと考えられる。

III. 病態からみた治療

以前の報告ではマイコプラズマ脳炎の予後は良くないとするものが意外に多い¹⁻³⁾。ただ現在の認識では、マイコプラズマ脳炎の予後は決して悪くなく、最近の筆者らのデータでは、回復までの日数は4週間程度かかる場合はあっても、80%強の患者ではほぼ完全に回復している⁹⁾。この差はおそらくマイコプラズマに対する特異的治療法の進歩というよりは、脳炎に対する一般的支持療法の進歩の差ではないかと考えられる。マイコプラズマ脳炎では抗菌薬による特異的治療が奏効したのか自然軽快かは不明な場合も多いが、重症例ではやはり積極的な治療が必要なことはいうまでもない。

前述したように、マイコプラズマ脳炎の発症機構は単一の要因で説明できるものではない。ただしそれが直接型の機序の場合はもちろんであるが、間接型の機序の場合においてもその引き金として、呼吸器粘膜上皮におけるマイコプラズマそのものの活発な増殖がまず脳炎発症の前提条件であると考えられる。この意味において、その後の進展が直接型機序であるにせよ間接型機序であるにせよ、まずは抗菌薬治療が基本であることは間違いない。ただし、くり返しになるが、マイコプラズマ脳炎においては中枢神経系内に実際に菌は存在していない場合も多いと考えられ、「中枢神経系内への移

行を考えてテトラサイクリン系が薦められる³⁾」とは一概にはいえない。発熱からの日数や臨床病型、あるいは経口摂取が可能であるか否かなどに応じた柔軟に対応する必要があると考えられる。

ステロイドの使用に関しては、ギラン-バレー症候群や遅発性脳炎の重症例など、一部の症例では適応となることは間違いない¹²⁾。しかし、これも新たな抗原の供給を断つという意味での抗菌薬を併用しつつ、使用することが望ましいと考えられる。経口薬でよいか静注薬が必要かは状況に応じた選択となる。

さらに新たな問題として、現時点ではまだ報告されていないが、マイコプラズマの薬剤耐性菌による脳炎の発症が危惧される。本稿では紙数の都合上詳論は避けるが、現在の日本ではマイコプラズマ野生株の約17%がマクロライド耐性であると考えられる¹³⁾。したがって、このような耐性菌が脳炎を発症する可能性は、決して小さいものではない。肺炎はほぼ間違いなく宿主の免疫応答による発症であり、菌そのものは宿主の免疫により除去されるのを待って最悪でも自然治癒が期待できるが、脳炎では積極的かつ速やかに中枢神経系内あるいは呼吸器粘膜上皮から菌そのものを除去しなければならない場合も想定される。この際には、当然ながら耐性菌にも有効な抗菌薬が選択されなければならない。クリンダマイシンは多くの場合マクロライドと交叉耐性があるので、ミノサイクリンあるいはニューキノロン系の合成抗菌薬なども視野において考える必要がある¹³⁾。

文 献

- 1) Pönkä A: Central nervous system manifestations associated with serologically verified *Mycoplasma pneumoniae* infection. Scand J Infect Dis 12: 175-184, 1980
- 2) Koskiniemi M, Vaheri A: Effect of measles, mumps, rubella vaccination on patients of encephalitis in children. Lancet i: 31-34, 1989
- 3) Lerer RJ, Kalavsky SM: Central nervous system disease associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection: Report of five cases and review of the literature. Pediatrics 52: 658-668, 1973
- 4) Narita M, Matsuzono Y, Togashi T, et al: DNA diagnosis of central nervous system infection by