

図 1. *M. pneumoniae* の P1 遺伝子の検出と型別を行う nested PCR 法のプライマー部位と増幅産物長の模式図。P1 遺伝子の RepMP4 部位をターゲットとする従来法と、今回デザインした RepMP2/3 部位をターゲットとする新しい方法を示した。

ADH2F	GGCAGTGGCAGTCAACAAACCACGTAT
ADH2R	GAACCTAGCGCCAGCAACTGCCAT
ADH3F	GAACCGAAGCGGCTTTGACCGCAT
ADH3R	GTTGACCATGCCTGAGAACAGTAA
ADH4F	GACCGCATCAACCACCTTTGCGTTACG
NI	CCCGGTGGTGGAAGTATTTT
2N2C	TGCCTTGGTCACCGGAGTTG
ADH3	CGAGTTTGCTGCTAACGAGT
MP2/3-R1	AGATTGACCTGAGCCTGAAG
MP2/3-F2	CACAAGTGGTTCGCGTTCCT
MP2/3-R2	GGCTGGGTGGAATGGTCTGT
MP2/3-F3	TCGACCAAGCCAACCTCCAG
R3-1	TTGGAATCGGACCCACTTCCG
R3-2	CGACGTTGTGTTTGTGCCAC
R3-2V	CGGTATAGCTAATTTGGTAC

表 1. P1 遺伝子 nested PCR 検出型別法に用いる各プライマーの塩基配列

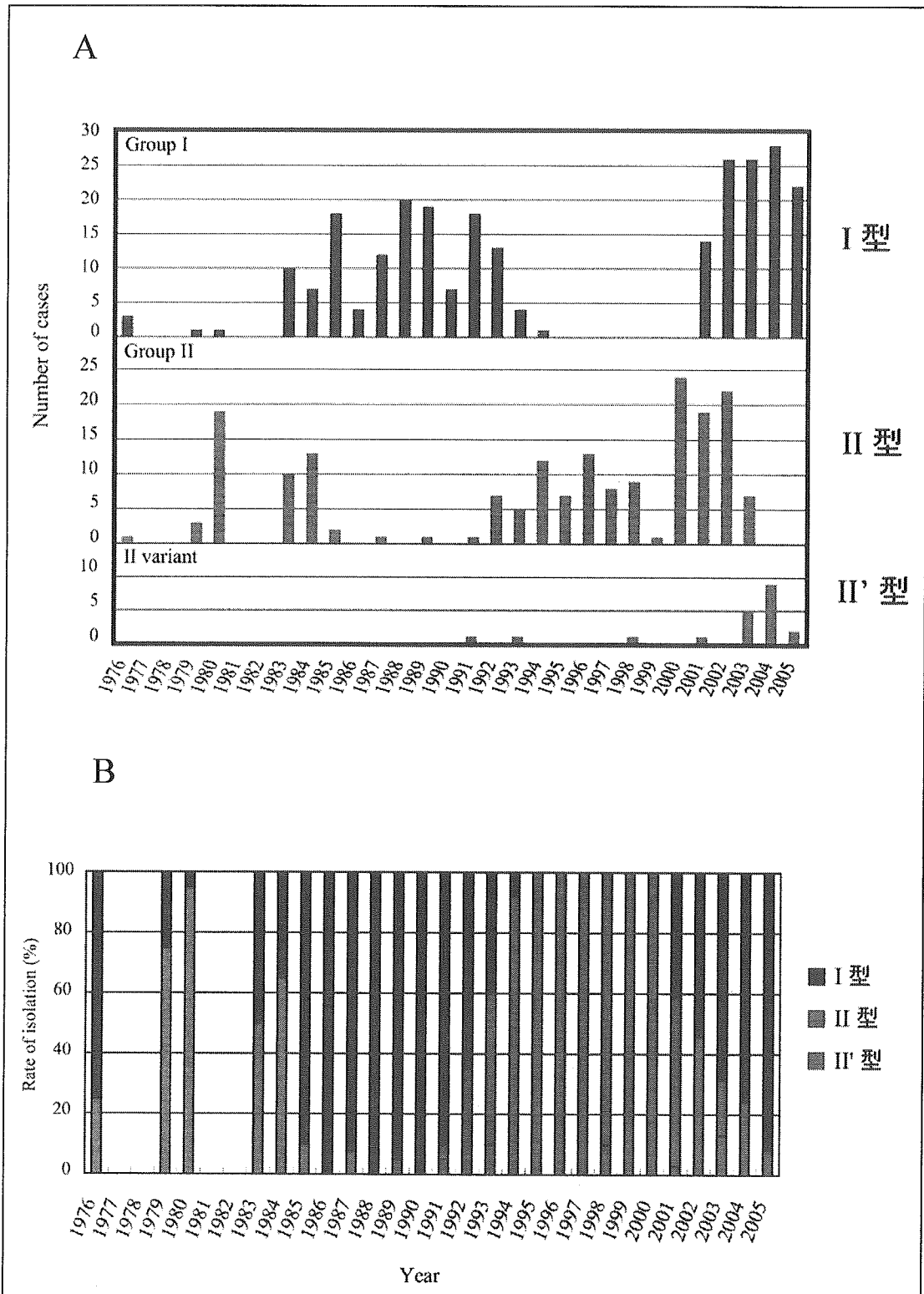


図 2. *M. pneumoniae* 菌型の出現動向

A. 年度ごとの各菌型の検出数。 B. 年度ごとの各菌型の検出比率

## 肺炎マイコプラズマ菌のマクロライド耐性化が臨床に及ぼす影響と問題点

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・微生物部・呼吸器系細菌

見理 剛，鈴木里和；国立感染症研究所・細菌第二部

山崎 努；埼玉医科大学・感染症科・感染制御科

田中裕士；札幌医科大学・第三内科

柴田健一郎；北海道大学・歯学研究科・口腔病態学・口腔分子微生物学

### 研究要旨

マクロライド耐性・肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) による下気道感染症 (11 例) の臨床経過を，マクロライド感受性菌 (26 例) によるそれと比較検討した。耐性菌感染においては全有熱期間 (中央値 8 日)，およびマクロライド剤投与後解熱までの期間 (中央値 3 日) は感受性菌による感染 (前者が 5 日，後者が 1 日) よりいずれも有意に延長していた ( $p < 0.05$ )。一方で，耐性菌感染においてもマクロライド剤投与後最大 11 日目までには全例解熱しており，またとりわけ重症化した例は無かった。マクロライド耐性・肺炎マイコプラズマは野生株の 15% 程度存在するが，現時点では健康被害に直結する大きな問題は無いと考えられる。

#### A. 研究目的

前年度までの研究において本研究者らは，2000 年以後の日本においては肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*，以下マイコプラズマと略す) 野生株の約 15% がマクロライド耐性であること，一方で耐性菌感染症例においても必ずしも重症化する傾向は認められていないことを報告した。今年度は症例数を増やすとともにその臨床経過を詳細に検討し，肺炎マイコプラズマ菌のマクロライド耐性化が臨床に及ぼす影響と問題点を明らかにする

ことを目的とした。

#### B. 研究方法

咽頭スワブを用いてのマイコプラズマ野生株の分離法，薬剤感受性試験の方法，薬剤耐性遺伝子変異の検索方法，および polymerase chain reaction (PCR) 増幅法と制限酵素切断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism) 解析を用いて臨床検体 (喀痰抽出 DNA など) から直接にマクロライド耐性遺伝子変異を検出する方法などについては，昨年度までの本

研究班報告書に記載したので省略する。

またこれに付随して、喀痰抽出 DNA からの PCR 法によるマイコプラズマ遺伝子検出の検討を行なった症例に関してはその血清についても、微粒子凝集 (PA) 法 (富士レビオ) により血清マイコプラズマ抗体価を測定し、PCR 法の結果を標準とした場合の PA 法の診断精度の検討も行なった。

耐性および感受性菌感染の臨床経過について、統計解析に関わる必要で十分な情報を得る目的で主治医に記載を依頼した書式のひな型も、昨年度の本研究班報告書に記載した。本検討においては、咳嗽などの呼吸器症状は程度の判断が主観的であり、また有症と治癒の判定が難しいため、マイコプラズマ感染症としての発症時期および治療効果の判定基準としては、38 度以上の発熱が 1 回以上認められた日を有熱日として、有熱期間を比較した。

対象とする症例の条件としては、①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、②血液検査にてマイコプラズマ抗体価が PA 法にて急性期で 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、および③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、中央値の比較にはウィルコクソンの順位差検定 (SPSS ソフト、バージョン 9.05) を用い、 $P < 0.05$  を有意の差と考えた。

(倫理面への配慮) 本研究においては分離菌株についての解析が主体であり、ヒト生体由来の材料は使用していない。また臨床経過の解析については数値化されたデータのみを用いており、患者の個人情報には完全に保護されている。PA 法による血清マイコプラズマ抗体検査については保護者の同意を得ている。

### C. 研究結果

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、年度ごとに偏りは有るものの、平均して耐性化率は 15% という前年度までの数字について、大きな変動は認められなかった。

喀痰抽出 DNA 検体を用いた PCR 法によるマイコプラズマ DNA の検索が行われた例のうち、マイコプラズマ DNA が陽性であった 66 件を含む 339 件において、PA 法による血清マイコプラズマ抗体の測定も行われ、このうち 106 件 (31.3%) が 1 : 40 倍以上の抗体を保有していた。その抗体価別の感度と特異性の内訳を表 2 に示した。本研究のごとく、単一血清では 1 : 640 倍以上を示した例をマイコプラズマ感染症と診断した場合の特異性は、99.3% であった。また PCR 法陽性例の中でペア血清が得られたのは 36 例で、そのうち PA 法にて 4 倍以上の上昇が得られたのは 30 例 (感度 83.3%) であり、一方、PCR 法陰性で 4 倍以上の上昇が認められた例は無かった (特異性 100%)。

研究方法に記載した基準を満たし、経過の解析が可能であった臨床例を表3にまとめた。マクロライド耐性菌感染症例（以下、耐性群）が11例で、対照として、同時期に得られたマクロライド感受性菌感染症例（以下、感受性群）26例を用いた。年齢、性別、マクロライド投与前有熱期間などには両群で差は無かった。マクロライド投与後の有熱期間が感受性群では中央値で1日（平均1.4日）であったのに対し、

耐性群ではこれが3日（平均4.3日）であり、耐性群では統計学的に有意に延長していた。これを反映し、感受性群では全有熱期間が中央値で5日（平均5.5日）であったのに対し、耐性群ではこれが8日（平均9.2日）であり、やはり耐性群では統計学的に有意に延長していた。なおマクロライド投与後48時間以上発熱が持続した患者の割合も、耐性群のほうが有意に高かった。

表1 平成17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	45	1	2.2	8	2	25.0
2005	20	7	35.0	—	—	—
計 *1	147	21	14.3	99	15	15.2

\*1 ; 2000～2005年の計

表2 PA法によるマイコプラズマ感染症診断の感度と特異性

PA抗体価	単一血清					ペア血清
	1:40	1:80	1:160	1:320	≥ 1:640	4倍以上の上昇
感度 (%)	89.4%	80.3%	71.2%	56.1%	50.0%	83.3%
特異性 (%)	83.7%	92.3%	96.0%	97.4%	99.3%	100%

PA法；微粒子凝集法。診断法として、喀痰抽出DNA検体を用いたPCR法によるマイコプラズマ遺伝子検出の結果を標準とした。

表3 マクロライド耐性および感受性菌感染症例の内訳と発熱期間の比較

		耐性菌感染症例 (11例)	感受性菌感染症例 (26例)	P値
年齢(歳) 範囲)	中央値(範囲)	9.0 (0・13)	5.5 (1・14)	0.30
	平均値	7.5	6.5	
性別	男/女	4/7	14/12	0.33
マクロライド (範囲)	中央値	3 (1・10)	4 (1・8)	0.40
	平均値	3.8	4.1	
マクロライド (範囲)	中央値	3 (1・11)	1 (1・5)	0.002
	平均値	4.3	1.4	
全有熱期間 (範囲)	中央値	8 (4・19)	5 (2・9)	0.031
	平均値	9.2	5.5	
マクロライド投与後 48 時間 以上発熱患者数 (%)		8 (72.7)	5 (19.2)	0.006

#### D. 考察

本邦およびヨーロッパの数カ国では、マイコプラズマ感染症診断において PA 法は標準法として認知されているが、マイコプラズマの血清診断法として ELISA 法が主体である米国においては、その信頼性の評価が意外なほど低い。その理由として、本法の精度について他法(とりわけ PCR 法)と厳密に比較して評価した報告がほとんど無かったことが挙げられる。この点、表2に示したごとく多数検体につき PCR 法を標準として本法の感度と特異性を検討した結果は、対外的な意味で重要である。この結果によると、PA 法の感度が意外に低いことがわかるが、これに関して

は、PA 法が IgM 抗体を主体に検出する方法であるため、IgM の変動を伴わない IgG あるいは IgA 抗体の変動を見逃している可能性が推測される。日本においてもマイコプラズマ感染診断に対し ELISA 法導入の必要性が考慮される。

マクロライドに対する耐性化率については、分離時期・分離地域によって多少の偏りは認められるものの、平均すると概ね 15% という数字はここ数年変動しておらず、とりあえず増加傾向は無く安定しているものと思われる。ニューキノロン系の合成抗菌剤を用いれば殺菌は可能であるが、一方でさらなる耐性菌を生む可能性も有り、その使用までの必要性が有るものか否か、

今後の検討課題である。

マクロライド耐性マイコプラズマが分離された症例の経過については、表3において感受性菌感染によるそれと比較検討した。ここに示したごとく、マクロライド剤投与後の有熱期間、全有熱期間、ともに耐性群では感受性群より統計学的に有意に延長していた。その一方で表1に示したごとく、現在の日本ではマイコプラズマ野生株の約15%前後がマクロライド耐性菌であるにもかかわらず、日常診療上、そのような状況は実感されていないものと考えられる。確かに耐性菌感染において有熱期間は延長しているものの、マクロライド剤投与後平均4日程度で解熱するということは、多くの場合主治医にとって明らかな治癒遷延例として問題が感じられるほどの数字ではないとも言える。また現在まで知り得た範囲では、耐性菌感染により、とりわけ重症化した例も報告されていない。少なくとも個々の症例を見る限り、肺炎マイコプラズマ菌のマクロライド耐性化は、臨床的に大きな影響を及ぼすものではないと考えられる。

そもそも肺炎マイコプラズマには、呼吸器粘膜において活性化酸素を過剰に産生させる以外には直接的な組織傷害性は無く、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るものと考えられている。このことが、肺炎マイコプラズマ菌自体はマクロライドに耐性化しても、臨床的に肺炎は必ずしも重症化しない主

な理由と考えられる。

一方で耐性菌感染症例において観察された発熱期間の延長は、同時に菌排出期間の遷延を示唆するものであり、耐性菌の蔓延がマイコプラズマ感染症の流行を拡大していく可能性は考えられる。根拠は無いが、2000年以後マイコプラズマ肺炎が年々増加している理由として、時を同じくしたマクロライド耐性菌の出現が一因となっていることも推測される。耐性菌の動向には今後とも注意が必要である。

## E. 結論

マクロライド耐性肺炎マイコプラズマによる肺炎では、発熱期間の延長は認められるものの、臨床経過が必ずしも重症化する傾向は認められていない。したがって当面は、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。一方で治癒遷延例あるいは重症例で、かつ耐性菌による感染が強く疑われる際には、以前に本研究にても報告したごとくテトラサイクリン系、あるいはニューキノロン系薬剤投与の必要性を考慮すべき場合も有る。

## F. 健康危険情報

特に無し。

## G. 研究発表

論文発表

Mitsuo Narita, Hiroshi Tanaka, Takehiro Togashi, Shosaku Abe.

- Cytokines involved in CNS manifestations caused by *Mycoplasma pneumoniae*. *Pediatr Neurol* 33; 105-109, 2005.
- Satowa Suzuki, Tsutomu Yamazaki, Mitsuo Narita, Norio Okazaki, Isao Suzuki, Tomoaki Andoh, Mayumi Matsuoka, Tsuyoshi Kenri, Yoshichika Arakawa, Tsuguo Sasaki. Clinical evaluation of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 50; 709-712, 2006.
- Hideo Kataoka, Motoaki Yasuda, Mitsuhiro Iyori, Kazuto Kiura, Mitsuo Narita, Takashi Nakata, Ken-ichiro Shibata. Roles of N-linked glycans in the recognition of microbial lipopeptides and lipoproteins by TLR2. *Cell Microbiol* 2006. (in press)
- 成田光生. マクロライド耐性肺炎マイコプラズマの性状と、その臨床における問題点。「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 16 年度総括・分担研究報告書. 55-63, 2005.
- 成田光生. 小児期マイコプラズマ感染症診断におけるマイコプラズマ特異的 IgG, IgA, IgM 抗体検出 enzyme-linked immunosorbent assay キットの有用性に関する検討. *感染症学雑誌* 79 ; 457-463, 2005.
- 成田光生. マイコプラズマ肺炎—診断と耐性菌に関する話題を中心に—日本胸部臨床 64 ; 778-786, 2005.
- 成田光生. 小児の治療指針. マイコプラズマ感染症. *小児科診療* 2006, 印刷中.
- 田中裕士, 成田光生. 気道系, 呼吸器系のマイコプラズマの現況. *感染と抗菌薬* 8 ; 386 - 392, 2005.
- 田中裕士, 成田光生, 高橋弘毅. 重症マイコプラズマ肺炎. *クリニカ* 32 ; 333 - 338, 2005.
- 成田光生. マイコプラズマ感染症. 山口 徹, 北原光夫, 福井次矢 総編集; 今日の治療指針 2006 年版 医学書院 東京 : 2006, 163.
- 成田光生. マイコプラズマ肺炎. 大関武彦, 古川 漸, 横田俊一郎 総編集; 今日の小児治療指針 第 14 版 医学書院 東京 : 2006, 印刷中.
- 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. 八戸小児科医学会. 平成 17 年 2 月, 八戸.
- 成田光生. 一般演題. *Mycoplasma pneumoniae* ELISA medac の有用性に関する検討. 第 32 回日本マイコプラズマ学会学術集会. 平成 17 年 5 月, 久留米.
- 成田光生. シンポジウム. マイコプラ



ズマ肺炎における‘*in vitro-in vivo paradox*’. 第32回日本マイコプラズマ学会学術集会. 平成17年5月, 久留米.

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40回埼玉県小児感染免疫懇話会. 平成17年7月, さいたま.

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. 所沢小児科医会第227回例会. 平成17年10月, 所沢.

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84回札幌市耳鼻咽喉科医会学術研修会. 平成17年11月, 札幌.

成田光生. 一般演題. *Mycoplasma pneumoniae* ELISA medacの有用性の検討. 第37回日本小児感染症学会総会. 平成17年11月, 津.

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. 苫小牧市小児科医会講演会. 平成18年2月, 苫小牧.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し

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

## *Haemophilus influenzae* 臨床分離株のペニシリン結合蛋白 (PBP3) の変異と薬剤感受性の比較解析

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** 国内の呼吸器由来 *Haemophilus influenzae* 臨床分離株を用いてペニシリン結合蛋白 (PBP3) の変異と薬剤感受性について解析を行った。 *pbp3* 遺伝子の変異を検出する PCR 法による遺伝子型と、薬剤感受性試験による表現型との相関を検討したところ  $\beta$ -ラクタマーゼ非産生株においては ABPC の MIC が 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  までは両者に乖離は殆どなかったが、調べた限りの ABPC の MIC が 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (中間) の株の約 30% で *pbp3* 遺伝子の変異 (BLNAR 型) し、ABPC 感性である MIC=1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の株でも数% が変異 (BLNAR 型) していた。  $\beta$ -ラクタマーゼ非産生で PBP3 が変異した株では、経口セファロスポリン系薬のセファクロル、セフカペン、セフポドキシムに対する感受性の低下が顕著であった。第 3 世代セファロスポリンのセフォタキシム、セフトジジムでも感受性低化の程度が高く、まだ頻度は低いが生感性の範疇 (MIC  $\leq 2\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を越える株も散見された。

研究協力者  
新谷三春  
(国立感染症研究所 細菌第二部)

結合蛋白 (PBP3) の変異が報告されている。そこで国内の呼吸器由来臨床分離株を用いて PBP3 の変異と薬剤感受性との関連性について比較解析を行う。

### 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。近年、 $\beta$ -ラクタマーゼ非産生であるのに ABPC に耐性を獲得した *H. influenzae* が報告され、その耐性機構としてペニシリン

### B. 研究方法

供試菌株：2002 年までに、国内において呼吸器材料から分離され、当部に保存されている *H. influenzae* 臨床分離株 634 株のうち 141 株を用いた。なお、この保存株全体の中で  $\beta$ -ラクタマーゼ非産生で ABPC の MIC が  $\geq 4\mu\text{g}/\text{ml}$  である株の比率は 4.9 % であった。

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。

薬剤感受性試験：NCCLS（現 CLSI）の推奨する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プイヨン「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。

$\beta$ -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）に含まれる acidimetry を用いた。

*pbp3* 変異の検出：インフルエンザ菌遺伝子検出試薬（湧永製薬）を用いた。使用説明書に従い Primer B で増幅しかつ Primer C で増幅しない遺伝子型を Wild 型、Primer B で増幅せずかつ Primer C で増幅する遺伝子型を BLNAR 型、Primer B で増幅せずかつ Primer C でも増幅しない遺伝子型を Low-BLNAR 型と記述した。

（倫理面への配慮）菌株の分離された患者の個人名や疾患名等を扱わないため、倫理審査の適用外と判断されたが、念のため、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実施した。

### C. 研究結果

$\beta$ -ラクタマーゼ産生株は保存株中に 61 株あり、それら全株について ABPC の MIC と PBP3 の変異との関係を表 1 に示した。MIC=32~128 では PBP3 に関して Wild 型が半分以上を占めたが MIC=256 では BLNAR 型の比率が高かった。

$\beta$ -ラクタマーゼ非産生株のうち

ABPC の MIC が >8, 8, 4 $\mu$ g/ml の株については全株、2, 1, 0.5,  $\leq$ 0.25  $\mu$ g/ml の株については無作為に選んで PBP3 の変異を調べた（表 2）。CSLI の定めるブレイクポイント (MIC,  $\geq$  4  $\mu$ g/ml) により ABPC 耐性と判定される  $\beta$ -ラクタマーゼ非産生株の大半は BLNAR 型の変異を持っていた。中間 (MIC, 2  $\mu$ g/ml) 株では 1/3 が BLNAR 型で、過半数が Low-BLNAR 型であった。

$\beta$ -ラクタマーゼ産生株の各 PBP3 遺伝子型に対する  $\beta$ -ラクタム薬の MIC 分布を図 1 に示した。PBP3 変異株は  $\beta$ -ラクタマーゼ産生と PBP3 変異の二つの耐性機構を合わせ持つために ABPC の MIC がさらに上昇しているように見えるが ABPC/SBT の MIC を見ると PBP3 変異の寄与は相加的で、大きくないと考えられる。第二世代セファロスポリンのセファクロルについては PBP3 変異株では耐性側にシフトしているが、第三世代セファロスポリンのセフトジジム、セフォタキシムについては PBP3 変異株では MIC が若干上昇する事はあるものの、なお感性の範疇に留まった。

$\beta$ -ラクタマーゼ非産生株の PBP3 遺伝子型毎の MIC 分布を図 2、図 3 に示した。薬剤によっては耐性側への分布の偏りが  $\beta$ -ラクタマーゼ産生株の場合よりも明瞭であった。PBP3 の変異に伴い上昇した ABPC の MIC は  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤（スルバクタム）の共存下でも下降せず、その点において  $\beta$ -ラクタマーゼ産生による ABPC 耐性とは明瞭に異なっている事が確認された。

ペニシリン系薬ではピペラシリンへの感受性変化の程度が低かった。

注射用セファロスポリン薬ではセフトキシム、セフトジジムで感受性低下の程度が高く、感性の範疇(MIC;  $\leq 2\mu\text{g/ml}$ )を越える株もあった。

経口セファロスポリン薬ではセフトアクトル、セフトカペン、セフトドキシムで感受性の低下が顕著で、セフトアクトルでは BLNAR 型の大半が耐性であった。セフトジレンは感受性低下の程度がやや低かった。

#### D. 考察

$\beta$ -ラクタマーゼ非産生であるのに ABPC に耐性を示す *H. influenzae* における主たる耐性機構として PBP3 の変異が報告されている。表現型としては  $\beta$ -ラクタマーゼ活性と ABPC を含む薬剤感受性試験を組み合わせれば、日常的な検査室における業務の範囲で判別可能と考えられる。PBP3 の変異に基づいて判定するならば、シーケンス解析によりアミノ酸レベルで詳しく変異を検出しなければならないが日常臨床検査としては困難であるので現在、PCR を利用して *pbp3* の変異を検出する研究用試薬が市販されている。今回はこの方法による遺伝子型と、薬剤感受性試験による表現型との一致状況を比較解析した。ABPC の MIC が  $4\mu\text{g/ml}$  までは両者に乖離は殆ど見られなかったが、調べた限りの ABPC の MIC が  $2\mu\text{g/ml}$  (中間) の株では約 30 % が BLNAR 型であり、感性である  $1\mu\text{g/ml}$  の株でも数%が BLNAR 型であった。この事実から、菌の膜の変化とともに PBP3 遺伝子の PCR プライマーとアニールする領域に、アミノ酸変異を引き起こさない、サイレントな変異が入る等の可能性も示唆されたため、その

理由について引き続き詳しい解析が必要である。

一方ペニシリン系薬の小児 *H. influenzae* 肺炎に対する臨床効果から見ると、起炎菌に対する ABPC の MIC が  $2\mu\text{g/ml}$  の場合ペニシリン系以外の抗菌薬に比べて治療効果は劣らないという報告があり、治療薬選択という目的のためならば、日常的な細菌検査の現場における遺伝子学的方法を用いての *pbp3* 変異型判定の実用性は低いかも知れない。

今回用いた試薬は、Wild 株として Rd KW20 株、BLNAR 株として ME870 株の、*ftsI* の大部分重なる領域を標的配列として、変異塩基を 3'末端としてプライマーを設計し、3'末端の塩基のミスマッチによる増幅効率の差を利用して野生型と変異型とを区別することを意図している。しかしながら今回の実験では Rd KW20 型配列にアニールするプライマーと ME870 型配列にアニールするプライマーの両方で増幅するものが数株あり、この原因については、細菌の膜の変化やプライマー領域のサイレントな変異など複数の因子が関与している可能性を考慮し、今後も引き続き検討課題としたい。

PBP3 は、セファロスポリン系薬の主たる標的分子であるため、PBP3 変異株はセファロスポリン系薬に対する感受性に、より強く影響を受けると言われてきた。我が国では、これまで経口セファロスポリン系薬が、外来施設で多用されてきたのも事実である。その結果、ペニシリン系薬よりもセファロスポリン系薬に対してより抵抗性を示す PBP3 変異株が選択されて来たとも指摘されている。最近、ファロペネムなどの新しい系

統の経口薬も認可され、外来診療現場において利用されるようになり、インフルエンザ菌を含む市井感染症、急性呼吸器感染症、耳鼻咽喉科領域感染症の起因菌における薬剤感受性の動向について引き続き監視を継続する必要がある。

#### E. 結論

呼吸器由来 *H. influenzae* 臨床分離株の  $\beta$ -ラクタマーゼ産生株及び  $\beta$ -ラクタマーゼ非産生株を *pbp3* 遺伝子変異の型により群別し、各種  $\beta$ -ラクタム薬に対する感受性を群間で比較した結果、 $\beta$ -ラクタマーゼ非産生株の方が Wild 型株と BLNAR 型株の感受性の差が大きくなる事が確認された。しかし、Low-BLNAR 型株は、 $\beta$ -ラクタマーゼ産生株及び  $\beta$ -ラクタマーゼ非産生株ともに Wild 型株との感受性の差は大きくはなかった。

BLNAR 型変異株の大部分は ABPC の MIC が  $4\mu\text{g/ml}$  以上でありその鑑別は  $\beta$ -ラクタマーゼ活性と ABPC の MIC を測定すればほぼ可能であると考えられる。しかし、その際には ABPC の MIC が  $2\mu\text{g/ml}$ 、 $1\mu\text{g/ml}$  の株の中には BLNAR 型株も存在することに留意する必要がある。BLNAR 型変異株ではセフアクトロル、セフカペン、セフポドキシムで感受性が低下し、また低頻度ながらセフォタキシム、セフトジジムに非感受性の株も見られたため、それらの動向について引き続き監視と解析が必要と考えられる。

#### F. 健康危険情報

$\beta$ -ラクタマーゼ非産生で PBP3 が変異した *H. influenzae* は第 3 世代セファロsporin のセフォタキシム、セフトジジムでも感受性低化の程度

が高く、まだ頻度は低いものの感性の範疇 (MIC,  $\leq 2\mu\text{g/ml}$ ) を越える株も散見されるため、それらの動向については、今後も引き続き監視が必要と考えられる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Huong P.L.T., Thi N.T., Anh D.D., Huong V.T.T., Minh L.N., Canh T.Q., Matsuoka M., Kamachi K., Yamazaki T., Arakawa Y., and Sasaki T. Genetic and Phenotypic characterization of *Haemophilus influenzae* type b isolated from children with meningitis and their family members in Vietnam. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2006.

##### 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。)

なし

表1. 各MICの株の中における各変異型の割合  
( $\beta$ -ラクタマーゼ産生株)

ABPCのMIC	BLNAR型変異株		Low-BLNAR型変異株		Wild型株	
512	0/1	0%	1/1	100%	0/1	0%
256	7/9	77.8%	1/9	11.1%	1/9	11.1%
128	3/18	16.7%	5/18	27.8%	10/18	55.6%
64	0/18	0%	2/18	11.1%	16/18	88.9%
32	0/9	0%	2/9	22.2%	7/9	77.8%
16	1/2	50%	0/2	0%	1/2	50%
8	2/4	50%	0/4	0%	2/4	50%
計	13/61		11/61		37/61	

表2. 各MICの株の中における各変異型の割合  
( $\beta$ -ラクタマーゼ非産生株)

ABPCのMIC	BLNAR型変異株		Low-BLNAR型変異株		Wild型株	
>8	6/6	100.0%	0/6	0.0%	0/6	0.0%
8	7/7	100.0%	0/7	0.0%	0/7	0.0%
4	14/15	93.3%	1/15	6.7%	0/15	0.0%
2	5/16	31.3%	9/16	56.3%	2/16	12.5%
1	1/16	6.3%	13/16	81.3%	2/16	12.5%
0.5	0/10	0.0%	5/10	50.0%	5/10	50.0%
$\leq 0.25$	0/10	0.0%	0/10	0.0%	10/10	100.0%
計	32/80		29/80		19/80	

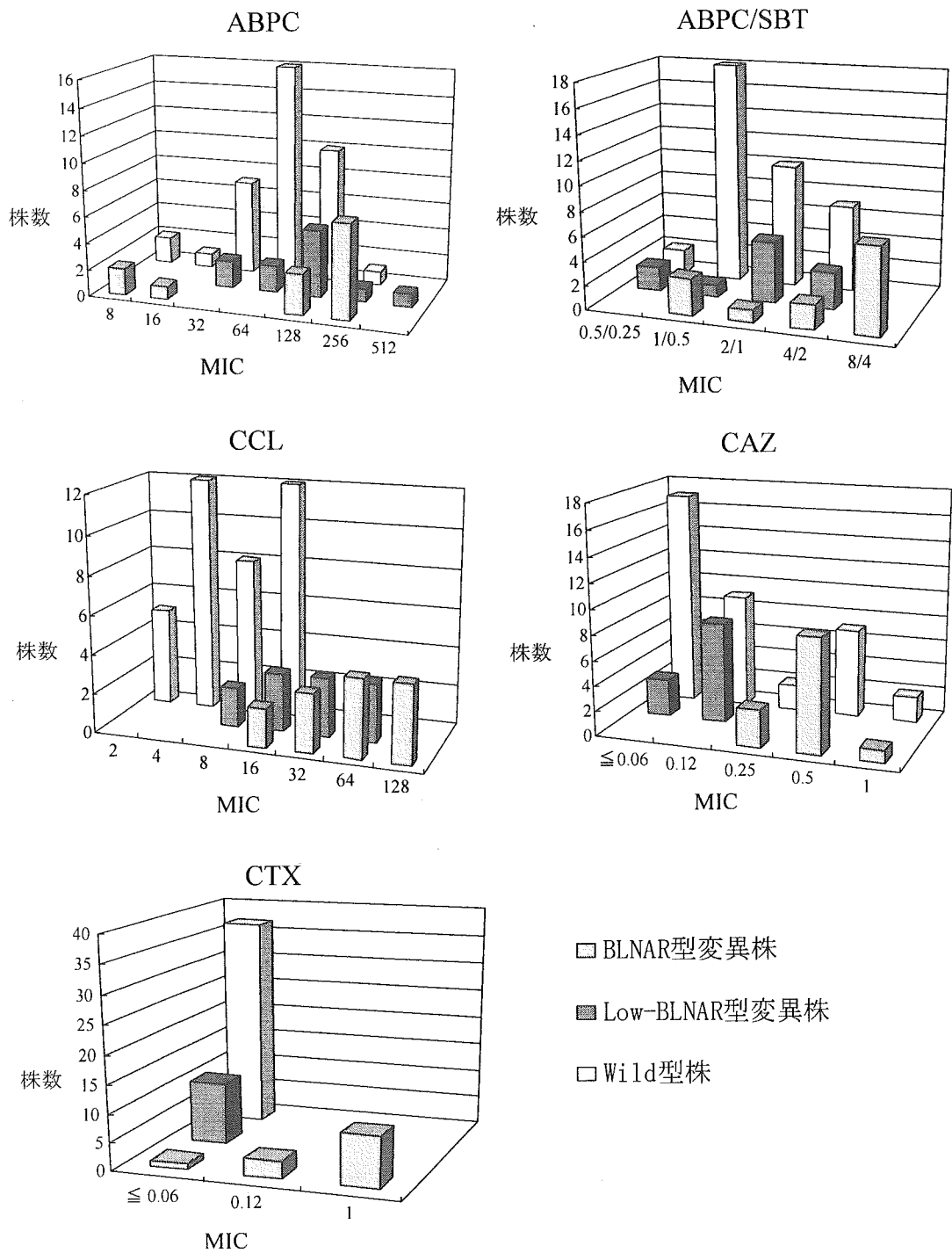


図1. 各 *pbp3* 遺伝子型を持つ  $\beta$ -ラクタマーゼ産生株に対する  $\beta$ -ラクタム薬のMIC分布

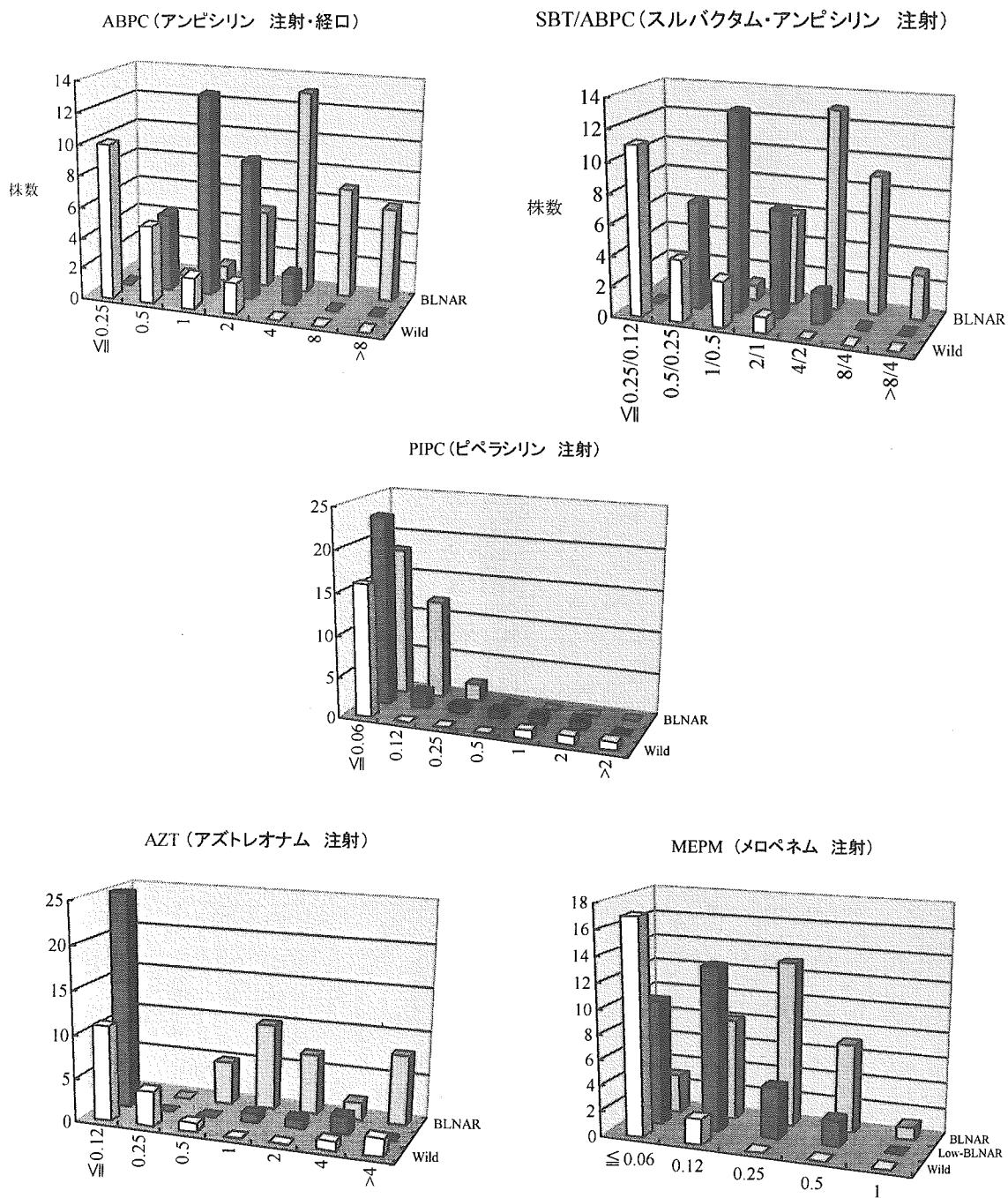


図2. 各 *pbp3* 遺伝子型を持つ  $\beta$ -ラクタマーゼ非産生株に対するペニシリン、モノバクタム、カルバペネム系薬の MIC 分布

縦軸：株数

横軸：MIC

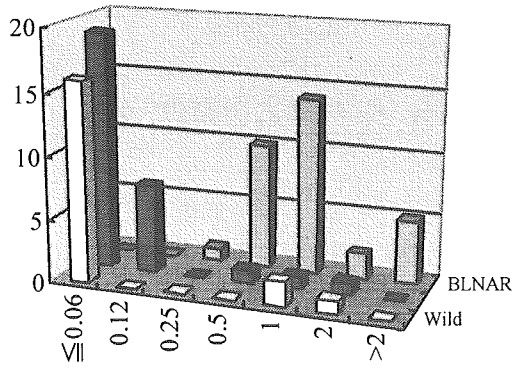
手前カラム：Wild 型株

中央カラム：Low-BLNAR 型変異株

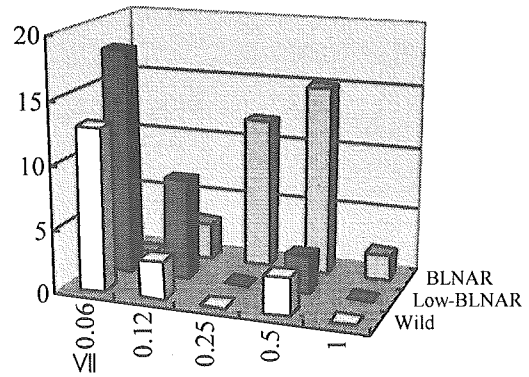
奥カラム：BLNAR 型変異株



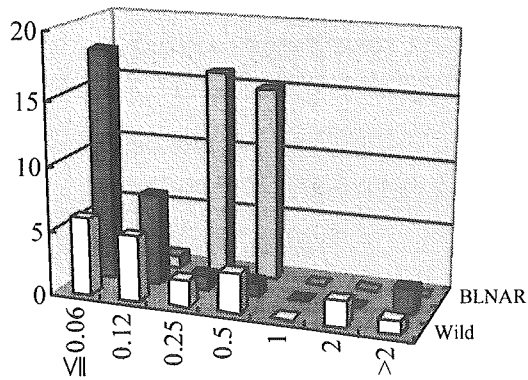
CTX (セフトキシム 注射)



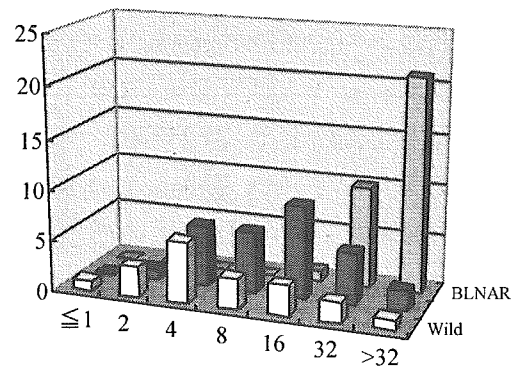
CTRX (セフトリアキソン 注射)



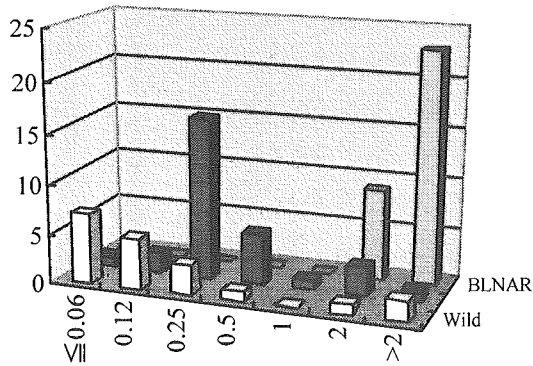
CAZ (セフトジジム 注射)



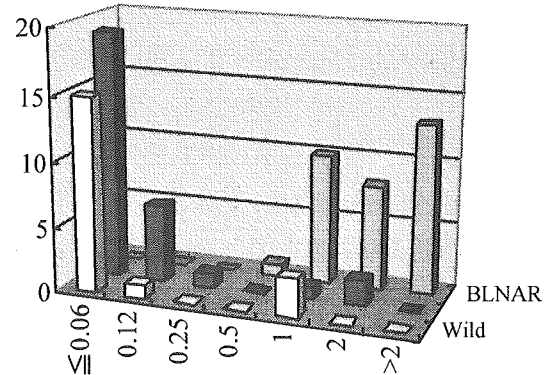
CCL (セファクロル 経口)



CPDX (セフポドキシム 経口)



CFPN (セフカペン 経口)



CDTR (セフジトレン 経口)

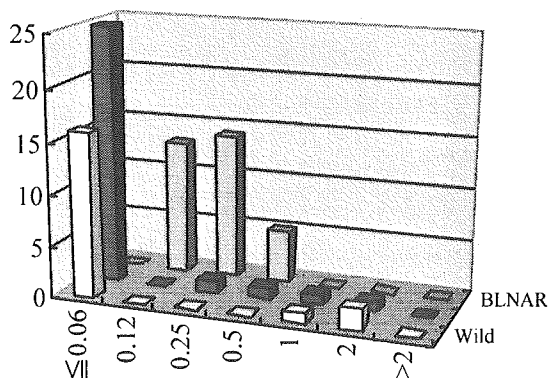


図 3. 各 *pbp3* 遺伝子型を持つ  $\beta$ -ラクタマーゼ非産生株に対する注射用・経口セファロsporin系薬の MIC 分布

縦軸：株数

横軸：MIC

手前カラム：Wild 型株

中央カラム：Low-BLNAR 型変異株

奥カラム：BLNAR 型変異株

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：インフルエンザ菌と他の呼吸器病原性微生物との混合感染を明らかにする目的で、肺炎小児 153 例由来の喀痰を用いて、洗浄培養法、PCR 法、RT-PCR 法により、細菌、*M. pneumoniae*、*C. pneumoniae*、インフルエンザウイルス A, B, C（以下 Flu A, B, C）、respiratory syncytial virus A, B（以下 RSA, RSB）、パラインフルエンザウイルス 1, 2, 3, 4 型（Para 1, 2, 3, 4）、ライノウイルス（Rhino）、コロナウイルス（Corona）、アデノウイルス（Adeno）の検索を行った。好気性培養にて原因菌として細菌が検出されたものは 76 例（49.7%）で、インフルエンザ菌 54（35.3%）、肺炎球菌 33（21.6%）、モラクセラ・カタラリス 3（2.0%）、A 群連鎖球菌 1（0.7%）であった。*M. pneumoniae* および *C. pneumoniae* の検出例は、各々 45（29.4%）、17（11.1%）であった。呼吸器ウイルスは 36 例（23.5%）で検出され、Flu A 6（3.9%）、Flu B 0（0%）、Flu C 1（0.7%）、RSA 3（2.0%）、RSB 3（2.0%）、Para 1 3（2.0%）、Para 2 0（0%）、Para 3 6（3.9%）、Para 4 2（1.3%）、Rhino 12（7.8%）、Corona 0（0%）、Adeno 21（13.7%）の検出数であった。単独感染あるいは混合感染と判定された症例は、各々 61 例（39.9%）、92 例（60.1%）であった。インフルエンザ菌は肺炎の原因微生物として、最も検出頻度が高いものであったが、他の呼吸器病原性微生物との混合感染も多く、インフルエンザ菌による単独感染の割合は、29.6%（16/54）であった。また、単独で肺炎の原因となる微生物は、*M. pneumoniae* が最も多く（23 例）インフルエンザ菌は 2 番目に多かった（16 例）。インフルエンザ菌は、1～2 歳（51%）および 3～5 歳（38%）での検出率が高く、各季節の症例から検出され 14～42% の検出率であった。各微生物の感染例について、平均年齢、経過中の最高白血球数・好中球数値、最高 CRP 値、有熱日数等について検討したところ、インフルエンザ菌による症例は *M. pneumoniae* による症例に比べて、有意に年齢が低く、経過中の最高白血球数は有意に高値であった。検出されたインフルエンザ菌の ABPC 感受性は、耐性（ABPC の MIC が 4.0  $\mu$ g/ml 以上）が 10%、中等度耐性（ABPC の MIC が 2.0  $\mu$ g/ml）が 18%、

感受性が72%であった。今後とも、インフルエンザ菌の薬剤耐性状況ならびに呼吸器病原性微生物の中でのインフルエンザ菌の役割について、経時的に検討していく必要があるものと考えらる。

#### A. 研究目的

我々は、平成15年度の本研究にて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。また、平成16年度は小児由来喀痰を用いた洗浄培養法により、インフルエンザ菌が小児肺炎の原因菌として重要であることを確認し、検出されたインフルエンザ菌の薬剤耐性が、臨床経過に及ぼす影響を検討した。これらの過程で、インフルエンザ菌感染症と判定された症例の中に、他の微生物との混合感染が多いことに気付いた。そこで今年度は、他の気道感染の原因となる微生物についても検討し、インフルエンザ菌との混合感染を明らかにするとともに、薬剤耐性を含めたインフルエンザ菌の臨床的意義を確定することを目的とした。

#### B. 研究方法

埼玉医科大学病院小児科を、肺炎の診断にて受診した153例の患児を対象とした。循環器系、神経系などの基礎疾患を有する児は除外した。平均年齢は3歳3ヶ月（4ヶ月～13歳）、男女比は71例／82例、入院／外来比は100例／53例であった。これらの患児より喀痰を採取し、生理食塩水にて喀痰を洗浄した後に、好気性培養を施行した。喀痰検体は-80℃にて凍結保存した後に、融解し2,000rpmで15分間遠心

した。さらに、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN K. K.)にてDNAを、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN K. K.)にてRNAを抽出し、以下の方法で呼吸器病原性微生物の検索を行った。

#### *M. pneumoniae* および *C. pneumoniae* 検出

抽出されたDNA検体を用いて、既報のPCR法（Matsuokaら、Kubotaら）により、*M. pneumoniae*および*C. pneumoniae*を検出した。

#### 呼吸器ウイルス検出

呼吸器病原性ウイルスの検出は、Coirasらの方法により施行した。インフルエンザウイルスA, B, C（以下Flu A, B, C）、respiratory syncytial virus A, B（以下RSA, RSB）、パラインフルエンザウイルス1, 2, 3, 4型（Para 1, 2, 3, 4）、ライノウイルス（Rhino）、コロナウイルス（Corona）については、抽出したRNA検体を用いてRT-PCR法により、アデノウイルス（Adeno）に関しては、抽出したDNAを用いてPCR法により、ウイルス検出を行った。

#### 臨床検査値、発熱期間等の比較

各微生物が検出された症例に関して、混合感染・単独感染の割合を判定した。また各微生物の感染例について、平均年齢、入院症例の比率、経過中の最高白血球数・好中球数値、最高CRP値、有熱日数等について検討した。

## 統計学的検討

各感染症例における測定値等の比較は、分散分析法により、 $p < 0.05$  を有意と判定した。

倫理面への配慮は、倫理規定に沿った。

## C. 研究結果

### 呼吸器病原微生物の検出

好気性培養にて原因菌として細菌が検出されたものは76例(49.7%)で、インフルエンザ菌54(35.3%)、肺炎球菌33(21.6%)、モラクセラ・カタラリス3(2.0%)、A群連鎖球菌1(0.7%)であった。*M. pneumoniae* および *C. pneumoniae* の検出例は、各々45(29.4%)、17(11.1%)であった。呼吸器ウイルスは36例(23.5%)で検出され、Flu A 6(3.9%)、Flu B 0(0%)、Flu C 1(0.7%)、RSA 3(2.0%)、RSB 3(2.0%)、Para1 3(2.0%)、Para2 0(0%)、Para3 6(3.9%)、Para4 2(1.3%)、Rhino 12(7.8%)、Corona 0(0%)、Adeno 21(13.7%)の検出数であった(表1)。単独感染あるいは混合感染と判定された症例は、各々61例(39.9%)、92例(60.1%)であった。

各微生物の年齢別検出状況を、表2に示す。インフルエンザ菌は、1~2歳(51%)および3~5歳(38%)での検出率が高かった。各微生物の季節別検出状況を、表3に示す。インフルエンザ菌は、各季節の症例から検出され、16~42%の検出率であった。

混合感染症例を含めて、各々の微生物による感染症例の平均年齢、入院症例の比率、経過中の最高白血球数・好中球数値、最高CRP値、有熱日数を、表

4に示す。インフルエンザ菌検出例では、肺炎球菌が検出された症例と類似した数値を取った。混合感染症例を除外した単独感染症例についてのみ、同様に検討すると(表3)、インフルエンザ菌による症例は *M. pneumoniae* による症例に比べて、有意に年齢が低く、経過中の最高白血球数は有意に高値であった。

検出されたインフルエンザ菌のABPC感受性は、耐性(ABPCのMICが $4.0 \mu\text{g/ml}$ 以上)が10%、中等度耐性(ABPCのMICが $2.0 \mu\text{g/ml}$ )が18%、感受性が72%であった。

## D. 考察

今回の検討でも、インフルエンザ菌は肺炎の原因微生物として、最も検出頻度が高いものであった。一方で、他の呼吸器病原性微生物との混合感染も多く、インフルエンザ菌による単独感染の割合は、29.6%(16/54)であった。また、単独で肺炎の原因となる微生物は、*M. pneumoniae* が最も多く(23例)インフルエンザ菌は2番目に多かった(16例)。これは、喀痰よりインフルエンザ菌が有意に検出されて、原因微生物と判定された場合でも、他の病原微生物の混合感染の可能性があり、臨床経過に及ぼす影響を念頭におく必要があることを意味する。

単独感染症例についてのみ検討すると、インフルエンザ菌による症例は *M. pneumoniae* による症例に比べて、有意に年齢が低かった。一方で、混合感染症例を含めると、インフルエンザ菌は年長児を含めて各年齢群より高頻