

- | | |
|--|------------------|
| 同学会. 2013年6月5日. 横浜市. | H. 知的財産権の出願・登録状況 |
| ● Kasahara K, Komatsu Y, Kuruno N, Nakayama A, Ui K, Mizuno F, Mikasa K, Kita E. Emergence of levofloxacin resistant pneumococci in patients colonized with levofloxacin susceptible pneumococci and exposed to insufficient doses of oral quinolones (一般演題). APIC 2013. Fort Lauderdale, USA. | 1. 特許取得
なし |
| ● 笠原 敬. ESBL 産生菌感染症に対する治療戦略 (シンポジウム). 第 26 回日本外科感染症学会総会学術集会. 2013年11月25日. 神戸市. | 2. 実用新案登録
なし |
| | 3. その他
なし |

マクロライド耐性マイコプラズマによる市中感染症の現状と
その治療効果に関する前向き観察研究

研究分担者	石黒信久	北海道大学病院 感染制御部 部長
研究協力者	小関直子	北海道大学医学研究科 小児科学分野
	海方美紀	北海道大学医学研究科 小児科学分野
	有賀 正	北海道大学医学研究科 小児科学分野 教授
	菊田英明	北海道大学 客員教授
	大庭幸治	北海道大学病院 高度先進医療支援センター 講師
	富樫武弘	札幌市立大学 看護学部 特任教授

研究要旨

【目的】小児におけるマクロライド(ML)耐性マイコプラズマ感染症の現状把握、各種抗菌剤の治療効果の追跡調査、マイコプラズマ感染症の迅速検査キットの感度・特異度の調査。

【方法】前向き観察研究（検体による探索的研究）。2012年12月1日より2014年1月12日までに合計550名の患者から検体を採取し、79名(14.4%)よりマイコプラズマ遺伝子を検出した。このうち44名の患者情報を取得し、各種抗菌剤の治療効果を判定した。

【結果】①79検体中37検体(46.8%)はML耐性マイコプラズマであり、全てA2063G変異を有していた。②ML耐性株の検出率には地域差が存在した。例えば、釧路市で採取された27検体全てが耐性株であるのに対して、旭川市で採取された17検体は全てが感受性株であった。③-1 抗菌薬開始から解熱するまでの日数を、ML感受性あるいは耐性株に分けて検討したところ、治療開始後2日以内に解熱する症例の82%はML感受性であり、発熱が3日以上持続する症例の86%はML耐性株であった。③-2 発熱から解熱するまでの日数で見ると、発熱後6日以内に解熱する症例の73%はML感受性、発熱が7日以上持続する症例の73%はML耐性株であった。④マイコプラズマ迅速検査（A社）は感度35%（13/37）、特異度94%（189/201）であった。

【結語】ML耐性マイコプラズマの検出には地域によって大きな偏りが存在した。各地域の臨床医は地域におけるML耐性マイコプラズマの検出率を知ったうえで治療にあたる必要がある。今後、地域毎に経時的なサーベイランスを継続することが必要である。

A. 研究目的

近年、マクロライド(ML)耐性マイコプラズマの出現が大きな問題となっている。ML耐性菌は *in vitro* の検査でエリスロマイシ

ン(EM)、クラリスロマイシン(CAM)、アジスロマイシン(AZM)等に対して耐性を示すが、臨床的にはML耐性菌による感染症の治療に対してMLが全く無効で、ミノサイ

クリン(MINO)やトスフロキサシン(TFLX)を必要とするのか等については統一した見解が得られていない。小児に対する MINO 使用は小児の健康問題（歯牙着色）、TFLX 使用は関節障害やキノロン耐性菌出現増加の危険性を抱えており、その安易な使用は慎むべきである。これらの理由から、ML 耐性マイコプラズマ感染症の現状把握とその治療指針の作成は急務である。

本研究では小児におけるマイコプラズマ感染症の実態を明らかにするとともに、それらに対する抗菌剤の選択を調査すること、マイコプラズマの ML 耐性率を調査すること、ML 耐性マイコプラズマ感染症に対する各種抗菌剤の治療効果を追跡調査すること、近年開発されたマイコプラズマ感染症の迅速検査キットの感度・特異度を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1. 研究の種類・デザイン

前向き観察研究（検体による探索的研究）

2. 対象患者

2012年12月1日以降、北海道大学病院小児科、東栄病院小児科など道内30余の医療機関に通院または入院したマイコプラズマ感染症（疑いも含む）患者のうち、18歳以下で、胸部レントゲン写真上で肺炎あるいは気管支炎の所見があり、本研究の参加にあたり十分な説明を受けた後、十分な理解の上、患者本人（代諾者を含む）の自由意思による文書同意あるいは口頭説明で同意が得られた患者を対象とする。迅速検査で他の病原体（アデノウイルス、溶連菌、RSウイルス等）が検出された患者は除外する。

3. 検体採取方法

喀痰（咽頭ぬぐい液でも可）を2本の綿

棒で採取する。採取した1本の検体はBDユニバーサルバイラルトランスポートに入れて、北海道大学大学院医学研究科小児科学分野に運び、「遺伝子検査方法」に示す測定をおこなう。残りの1本は各医療機関にてマイコプラズマ感染症の迅速検査キットにて検査を行う。

4. 遺伝子検査方法

採取した咽頭ぬぐい液から QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN 社)を用いて核酸を抽出し、real-time PCR 法にてマイコプラズマ遺伝子を検出する。プライマーの設計や各種条件設定は Winchell らの報告に従った(J. Clin. Microbiol. 2008, 46(9): 3116)。ML 耐性遺伝子の検出は Matsuoka らの報告に従い、23S リボソーム RNA ドメイン V 上の A2063C, A2063G, A2064G, C2617G 変異の有無を検査した(Antimicrob Agents Chemother. 48: 4624, 2004)。

5. 被験者の診療情報

以下の項目について、被験者への調査票と主治医への調査票から情報を入手する。

被験者への調査票から入手する診療情報：①性別、②生年月日、③発症日（体温が37.5度以上になった日、咳嗽が出現した日）と体温・咳嗽の推移、④マイコプラズマ感染症と診断され、抗菌薬が処方された日、⑤④以降の体温・咳嗽の推移、⑥抗生剤の服用状況。

主治医への調査票から入手する診療情報：①整理番号、②患者の体重、③疾患情報（マイコプラズマ感染症と診断した日、感染症名）、④迅速検査の結果、⑤基礎疾患、⑥血液検査所見、⑦胸部レントゲン検査所見、⑧経過中に処方した抗菌薬に関する情報、⑨その他の併用薬、⑩入院した場合にはその期間、血中酸素飽和度の最低値、治療、⑪有害事象（抗菌薬と因果関係がある

と推定される場合)。

6. 統計学的解析

主要評価項目は抗菌薬服用開始日から解熱(37.5度未満)までに要した時間とする。

ML感受性あるいはML耐性マイコプラズマ感染症患者に使用された抗菌薬の効果を検定する場合、抗菌薬服用開始日から解熱(37.5度未満)までに要した時間を横軸、37.5度以上の有熱率を縦軸とする Kaplan-Meier 曲線を作成し、ログランク検定(log-rank test)を用いて2つの曲線の差を検定する。

Cox 比例ハザード・モデルを用いて、抗菌薬服用開始日から解熱(37.5度未満)までに要した時間に影響を与える因子を解析する。

7. 倫理的配慮

本研究のすべての担当者は、「ヘルシンキ宣言(2008年10月修正)」および「臨床研究に関する倫理指針(平成20年7月31日改正、以下臨床研究倫理指針)」を遵守して実施する。本研究は、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の審査を経て、北海道大学病院により承認されている(臨床研究番号:自012-0174)。

C. 研究成果

1. 検体収集状況

2012年12月1日より2014年1月12日までに合計550名の患者から検体を採取し、79名(14.4%)よりマイコプラズマ遺伝子を検出した。このうち44名の患者情報を取得した。

2. ML耐性マイコプラズマの検出状況

79検体中42検体(53.2%)はML感受性マイコプラズマであり、37検体(46.8%)はML耐性マイコプラズマであった。ML耐性株は全てA2063G変異を有していた。

但し、ML耐性株の検出率には地域差が存在した。例えば、釧路市で採取された27検体全てが耐性株であるのに対して、旭川市で採取された17検体は全てが感受性株であった(図1)。札幌市で採取された22検体中9検体(41%)がML耐性株であったが、市内の地区によりその検出率に違いがある可能性が存在した(図2)。

全体でみれば、入院患者におけるML耐性株の検出率は外来患者よりも高く(14.3% vs 40.0%, $P=0.0831$)、病院におけるML耐性株の検出率はクリニックよりも高かった(69.4% vs 10.0%, $P<0.0001$) (表1)。ところが、(ML耐性株の検出率が100%の)釧路市で採取された検体を除外すると、入院患者と外来患者におけるML耐性株の検出率に有意差はなくなり、病院とクリニックにおけるML耐性株の検出率も僅差となった(表1)。

3. ML感受性株と耐性株による有熱期間

44名の患者背景を表2に記載した。入院患者にML耐性株の検出率が高いこと、入院患者と外来患者との間に最初に選択された抗菌薬の選択に偏りがあることを除けば、年齢、性別、マイコプラズマ遺伝子のコピー数、発熱から治療開始までの日数に差異はなかった。

抗菌薬開始日から解熱までの日数に関与する各種因子をCox回帰分析による多変量解析にて解析したところ、入院の有無、最初に選択した抗菌薬、ML耐性遺伝子が影響を与えることが判明した(表3)。即ち、入院患者に比べて外来患者では解熱する確率が3.36倍高く、TFLXに比べてMINOでは解熱する確率が16.1倍高く、TFLXに比べてMLでは解熱する確率が4.7倍高く、ML耐性に比べてML感受性では解熱する確率が5.5倍高かった(表3)。

ML 感受性株と耐性株の違いによる解熱時間を最初に選択した抗菌薬別に解析したところ、ML 耐性株に ML 系抗菌薬（クラリスロマイシン、アジスロマイシン）を使用した場合、ML 感受性株に比べて発熱が 3 日間程度長引くことが判明した（図 3）。MINO を使用した症例は全て ML 感受性株による感染であった。TFLX を使用した症例数は少ないが、ML 感受性と ML 耐性株による有熱期間の差はなかった（図 3）。

抗菌薬開始から解熱するまでの日数を、ML 感受性あるいは耐性株に分けて検討したところ、治療開始後 2 日以内に解熱する症例の 82% は ML 感受性であり、発熱が 3 日以上持続する症例の 86% は ML 耐性株であった（図 4）。発熱から解熱するまでの日数でみると、発熱後 6 日以内に解熱する症例の 73% は ML 感受性、発熱が 7 日以上持続する症例の 73% は ML 耐性株であった（図 5）。

ML 系抗菌薬（クラリスロマイシン、アジスロマイシン）を最初に選択した症例に限って検討したところ、治療開始後 2 日以内に解熱する症例の 87% は ML 感受性であり、発熱が 3 日以上持続する症例の 83% は ML 耐性株であった（図 6）。発熱から解熱するまでの日数でみると、発熱後 6 日以内に解熱する症例の 87% は ML 感受性、発熱が 7 日以上持続する症例の 78% は ML 耐性株であった（図 7）。

4. 迅速検査（A 社）の感度・特異度

マイコプラズマ遺伝子検査と迅速検査の両方を行い得た 238 検体について、遺伝子検査を基準として迅速検査（A 社）の感度と特異度を算出したところ、感度 35%（13/37）、特異度 94%（189/201）であった（表 4）。

D. 考察

1. ML 耐性マイコプラズマの検出頻度

全体の集計では、ML 耐性株の占める割合は 46.8%（37/79）であったが、ML 耐性率には地域による大きな偏り（例：釧路市では 100% 耐性株、旭川市では 100% 感受性株）が存在した。「ML 耐性株 46.8%」が「目前のマイコプラズマ感染症患者の半数が ML 耐性株に感染している」ことを示しているわけではないことに注意する必要がある。

入院患者と外来患者の ML 耐性率には有意差があるが（入院患者 40.0%、外来患者 14.3%、 $P=0.0831$ ）、釧路市で採取された検体を対象から除外すると有意差はなくなる。地域による ML 耐性率の違いが与える影響が最も大きいことを示している。

ML 感受性株が流行している地域には ML 耐性株は流行しないのであろうか？その逆は如何か？今後とも地域毎に経時的なサーベイランスが必要と思われる。

2. ML 耐性株と ML 感受性株による感染症は有熱期間から区別が可能か？

治療開始後 2 日以内に解熱する症例の 82% は ML 感受性であり、発熱が 3 日以上持続する症例の 86% は ML 耐性株であるので、「治療開始後 2 日以内に解熱するか否か」によって、ある程度の区別が可能である。

3. MINO や TFLX は ML 耐性株に有効か？

MINO 使用例は全て ML 感受性株であったので評価は不能である。TFLX 使用例は症例数が少ないが、ML 感受性株と ML 耐性株とで抗菌薬開始日から解熱までの日数に差異はなかった。今後、症例数を積み重ねる必要がある。

4. 抗原迅速検査は有用か？

A 社製品のみでの評価であるが、特異度に優れている（94%）ものの、感度は劣っていた（35%）。現時点では、抗原迅速検査の結果に

頼って診療を行うことは慎むべきであろう。

E. 結論

ML 耐性マイコプラズマの検出には地域によって大きな偏りが存在した。各地域の臨床医は地域における ML 耐性マイコプラズマの検出率を知ったうえで治療にあたる必要がある。今後、地域毎に経時的なサーベイランスを継続することが必要である。

※謝辞：

本研究にご協力頂いた先生方に厚く御礼申し上げます。森田啓介先生（旭川赤十字病院小児科）、岡村暁子先生（うめつ小児科）、山崎茂先生（ウルトラ内科小児科クリニック）、梶井直文先生、信太知先生（江別市立病院小児科）、永島哲郎先生、仲西正憲先生（釧路赤十字病院小児科）、高橋豊先生、吉岡幹朗先生（KKR 札幌医療センター小児科）、上野範博先生（琴似小児科クリニック）、今野武津子先生（札幌厚生病院小児科）、川村信明先生（市立札幌病院小児科）、石坂明人先生（住吉こどもクリニック）、高田 公彦先生（たかだ小児クリニック）、竹林武恭先生（竹林小児科医院）、菊田英明先生（特定医療法人とこはる 東栄病院小児科）、長野奈緒子先生（ながのこどもクリニック）、柴田睦郎先生（北海道医療大学病院小児科）、澤田博行先生、古山秀人先生（北海道社会保険病院小児科）、松菌嘉裕先生（まつぞの小児科医院）、小池明美先生（宮の沢小池こどもクリニック）、古賀康嗣（みんなのこどもクリニック）、村下眞理（むらしたこども

クリニック）、畑江 芳郎先生、大倉有加先生（医療法人北農会 恵み野病院小児科）、山中樹先生（医療法人社団 山中たつる小児科）、渡辺徹先生（わたなべ小児科・アレルギー科クリニック）、田端祐一先生（岩見沢こども・産科婦人科クリニック）、汲田喜宏先生（医療法人社団 くみたこどもクリニック）、間峯介先生（はざま小児科クリニック）、内藤広行先生（市立千歳市民病院小児科）、飽津泰史先生（医療法人社団 あくつこどもクリニック）、青柳勇人先生（帯広協会病院小児科）、飛世克之先生、飛世千恵先生（とびせ小児科内科医院）、東克己先生（あずま子ども家庭クリニック）、佐々木聡先生（財団法人小児愛育協会附属 愛育病院）、坪内友先生（医療法人社団香友会 富丘まごころ内科クリニック）。（順不同）

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産の出願・登録情報

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

図1 マクロライド耐性マイコプラズマの検出状況

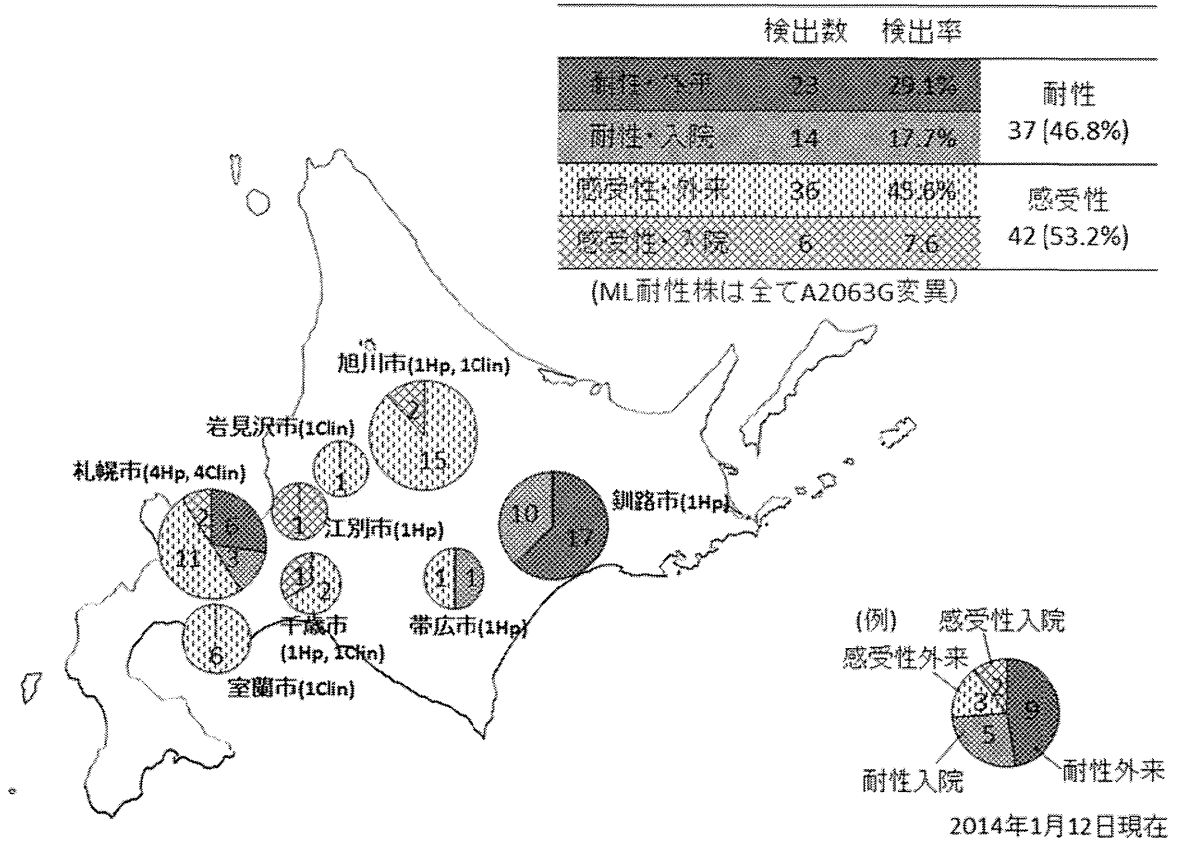


図2 マクロライド耐性マイコプラズマの検出状況：札幌市

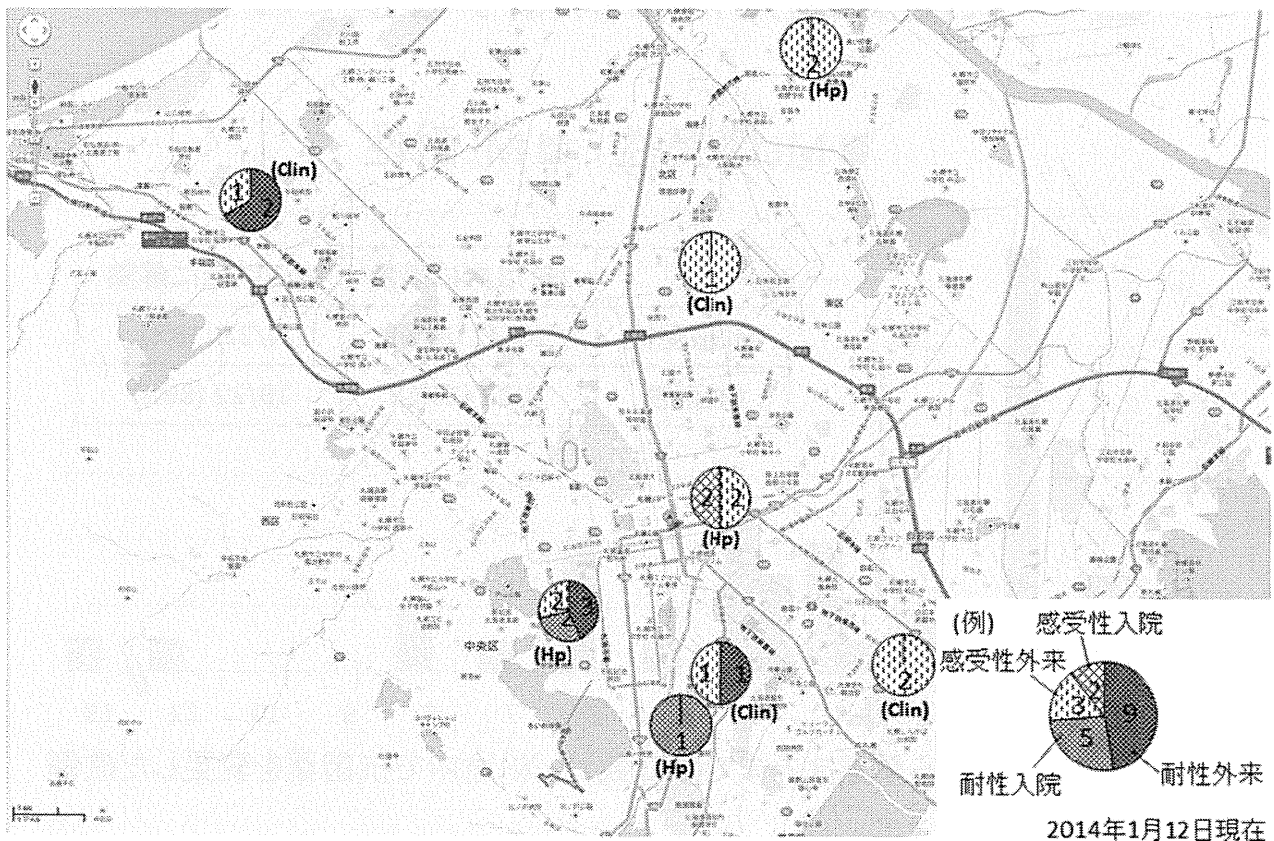


図3 ML感受性と耐性の違いによる解熱時間

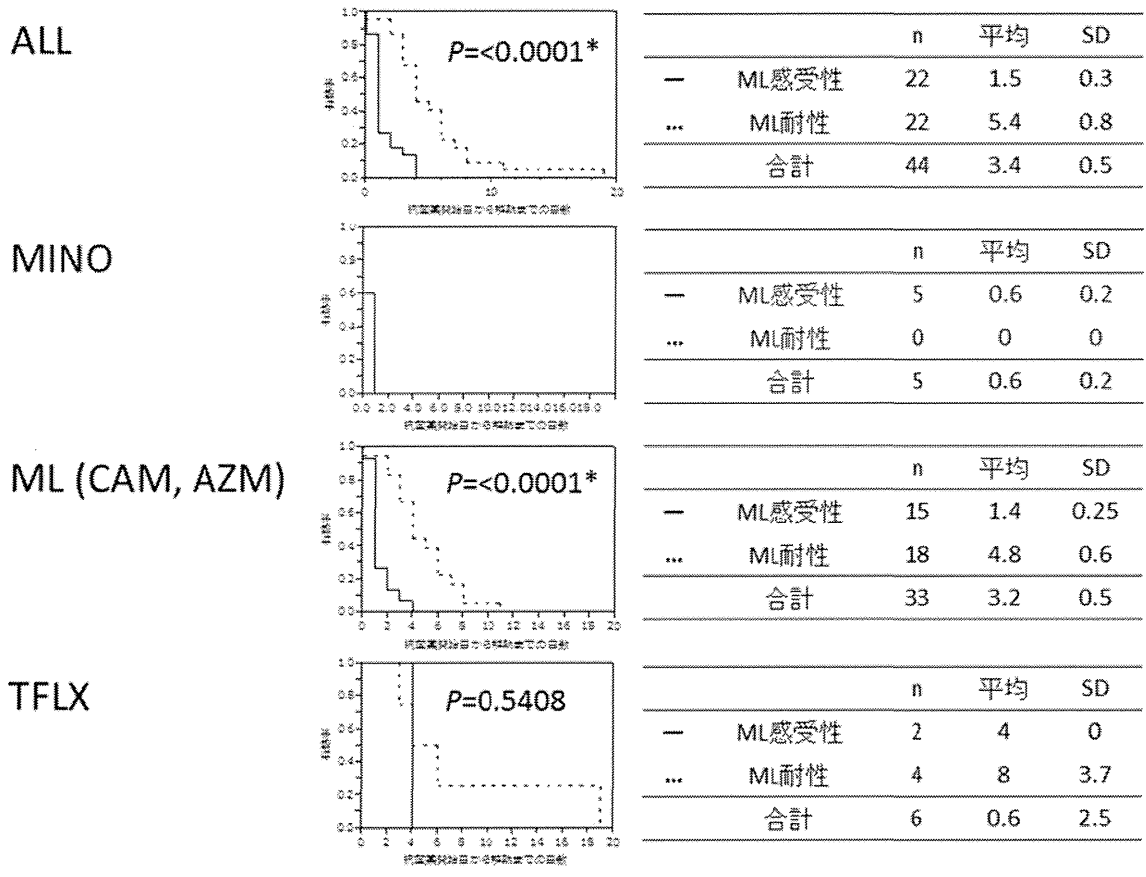


図4 抗菌薬開始から解熱するまでの日数

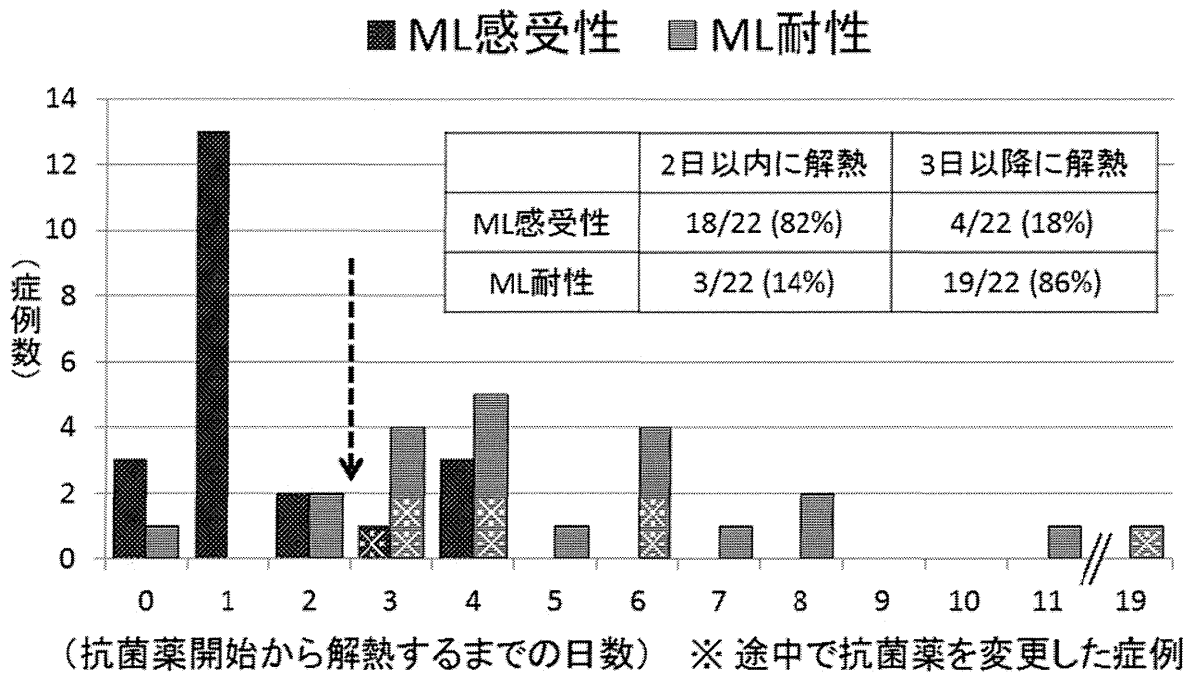


図5 発熱から解熱するまでの日数

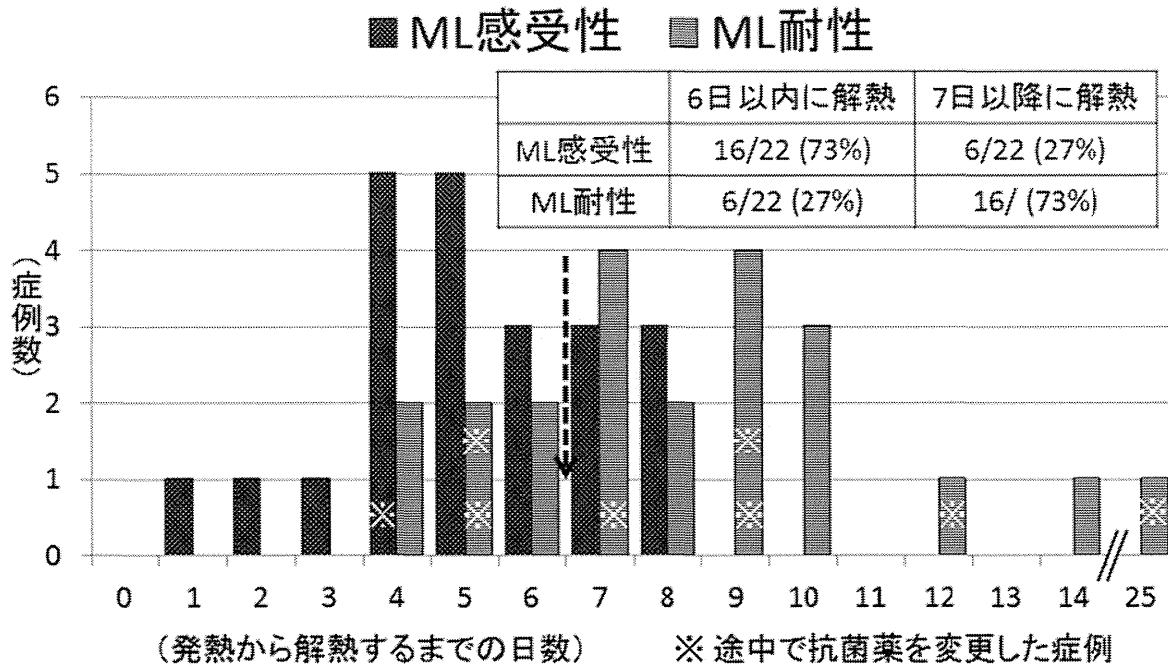


図6 ML(CAM, AZM)開始から解熱するまでの日数

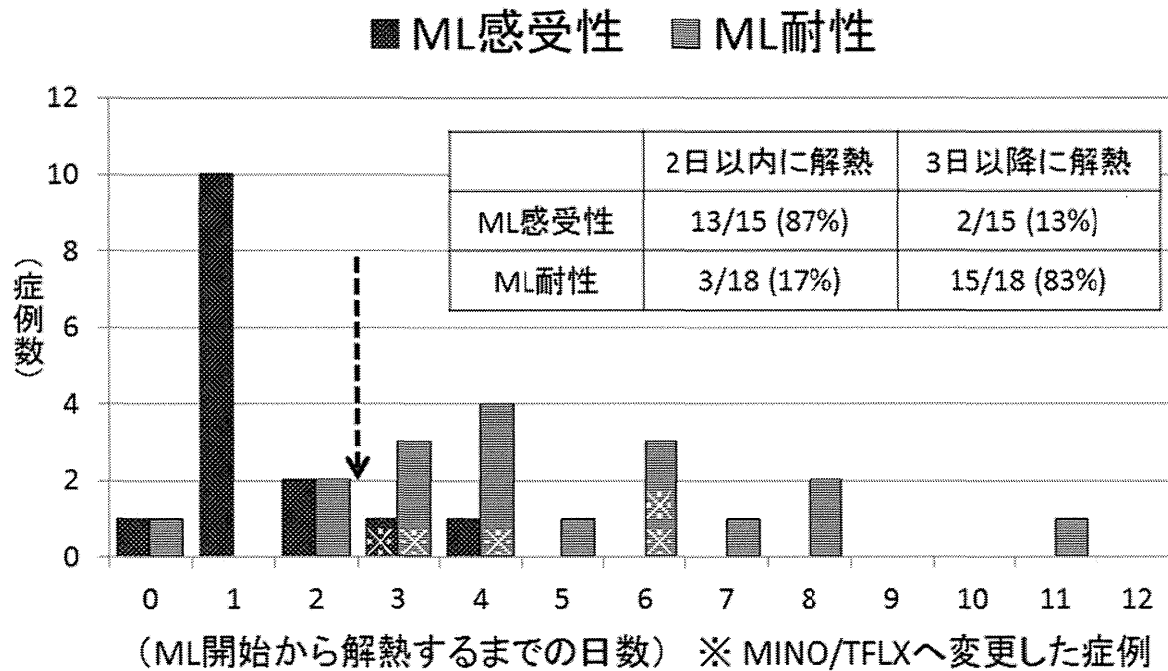


図7 発熱から解熱するまでの日数
ML(CAM, AZM)服用症例

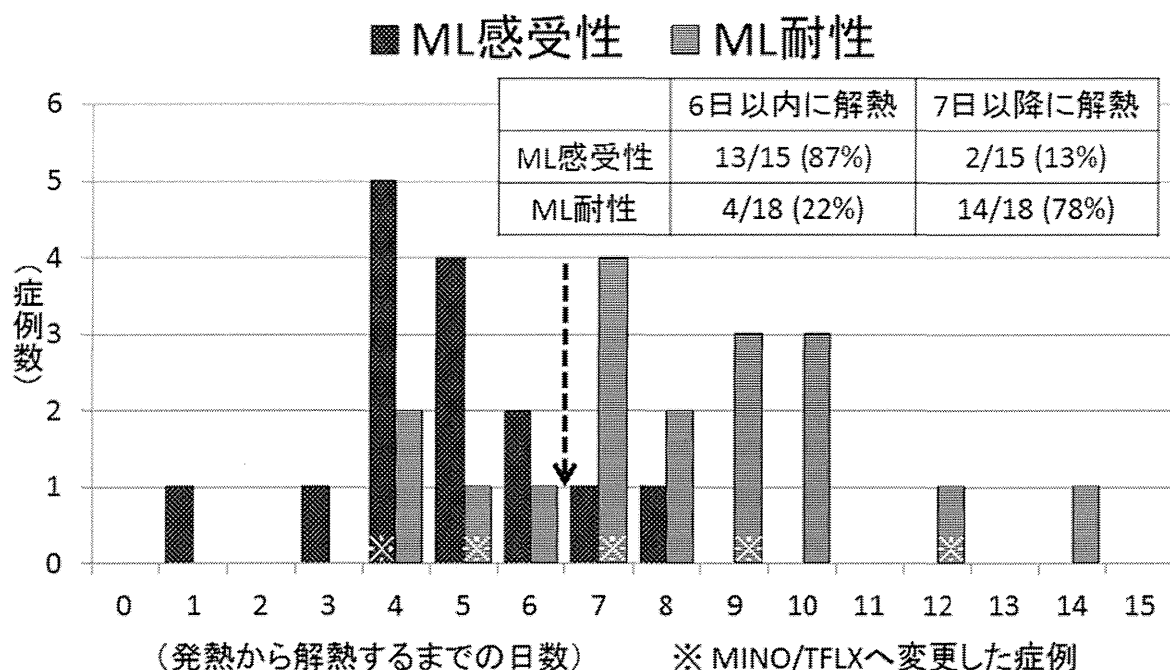


表1 マクロライド感受性菌と耐性菌の検出

	ML感受性	ML耐性	P		ML感受性	ML耐性	P
	42	37			42	10	
外来	36 (61.0%)	23 (39.0%)	0.0155*	外来	36 (85.7%)	6 (14.3%)	0.0831
入院	6 (30.0%)	14 (70.0%)		入院	6 (60.0%)	4 (40.0%)	
クリニック	27 (90.0%)	3 (10.0%)	<0.0001*	クリニック	27 (90.0%)	3 (10.0%)	0.0487*
病院	15 (30.6%)	34 (69.4%)		病院	15 (68.2%)	7 (31.8%)	
旭川	17 (100.0%)	0 (0.0%)	<0.0001*	旭川	17 (100.0%)	0 (0.0%)	0.0054*
岩見沢	1 (100.0%)	0 (0.0%)		岩見沢	1 (100.0%)	0 (0.0%)	
釧路	0 (0.0%)	27 (100.0%)		江別	1 (100.0%)	0 (0.0%)	
江別	1 (100.0%)	0 (0.0%)		札幌	13 (59.1%)	9 (40.9%)	
札幌	13 (59.1%)	9 (40.9%)		室蘭	6 (100.0%)	0 (0.0%)	
室蘭	6 (100.0%)	0 (0.0%)		千歳	3 (100.0%)	0 (0.0%)	
千歳	3 (100.0%)	0 (0.0%)		帯広	1 (50.0%)	1 (50.0%)	
帯広	1 (50.0%)	1 (50.0%)		(釧路市を除く)			

検定はカイ2乗検定

表2 患者背景

		ML感受性	ML耐性	P
患者数		22	22	
年齢(歳)	平均±標準偏差	9.1 ± 3.0	8.9 ± 3.1	0.8448
	範囲	3 - 14	4 - 15	
性別	女性患者数 (%)	13 (59.1%)	11 (50.0%)	0.5445
	男性患者数 (%)	9 (40.9%)	11 (50.0%)	
コピー数(Rx)	平均±標準偏差	1535 ± 4078	1391 ± 2423	0.8879
	範囲	1 - 16615	3 - 10591	
外来/入院別	外来患者数 (%)	18 (81.8%)	12 (54.6%)	0.0493*
	入院患者数 (%)	4 (18.2%)	10 (45.4%)	
発熱から治療開始までの日数	平均±標準偏差	3.7 ± 2.1	3.3 ± 2.2	0.5325
	範囲	0 - 7	0 - 6	
最初に選択した抗菌薬	ML (CAM, AZM)	15 (68.2%)	18 (81.8%)	0.0513
	MINO	5 (22.7%)	0 (0.0%)	
	TFLX	2 (9.1%)	4 (18.2%)	

表3 抗菌薬開始日から解熱までの日数に関する各種因子 (Cox回帰分析による多変量解析)

独立因子	基準	ハザード比	(95%信頼区間)	P
年齢	1歳当り	0.92	(0.79-1.06)	0.2595
性別	女性	0.82	(0.40-1.63)	0.5766
コピー数	1コピー当り	1.0	(1.00-1.00)	0.3059
外来・入院 ⁺	入院	3.36	(1.40-8.91)	0.0058*
発症～抗菌薬開始日	1日当り	2.98	(0.76-12.12)	0.1711
最初の抗菌薬の選択				
MINO ⁺⁺	TFLX	16.1	(2.44-123.34)	0.0037*
ML ⁺⁺⁺	TFLX	4.7	(1.53-16.74)	0.0060*
抗菌薬変更の有無	変更無し	2.4	(0.62-9.38)	0.2007
ML耐性 ⁺⁺⁺⁺ の有無	ML耐性有	5.5	(2.17-14.90)	0.0003*

⁺ 入院患者に比べて外来患者では解熱する確率が3.36倍高い。

⁺⁺ TFLXに比べてMINOでは解熱する確率が16.1倍高い。

⁺⁺⁺ TFLXに比べてMLでは解熱する確率が4.7倍高い。

⁺⁺⁺⁺ ML耐性有に比べてML耐性無では解熱する確率が5.5倍高い。

表4 マイコプラズマ抗原迅速検査(A社)と遺伝子検査

	遺伝子検査 陽性	遺伝子検査 陰性	
迅速検査陽性	13	12	陽性一致率 52% (13/25)
迅速検査陰性	24	189	陰性一致率 75% (189/213)
	感度 35% (13/37)	特異度 94% (189/201)	合計238検体

図1 マクロライド耐性マイコプラズマの検出状況

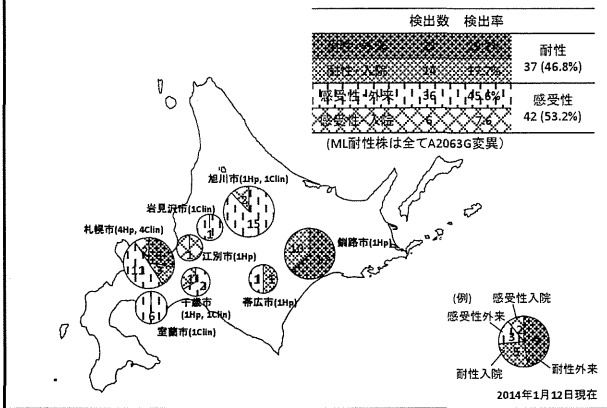


図2 マクロライド耐性マイコプラズマの検出状況: 札幌市

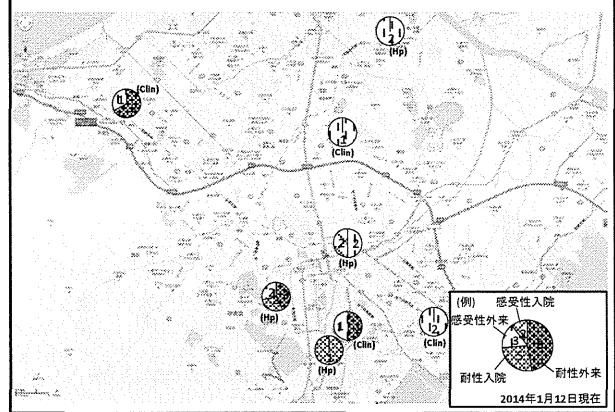


図3 ML感受性と耐性の違いによる解熱時間

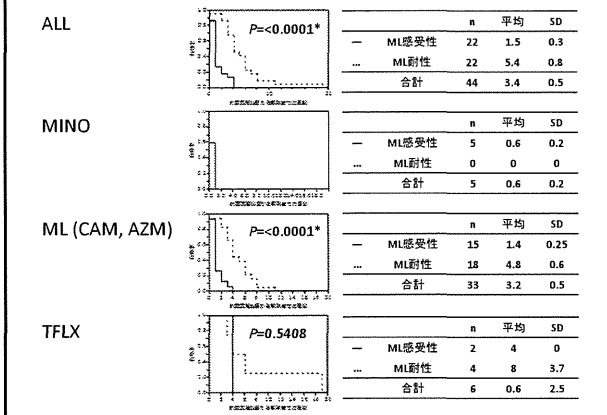


図4 抗菌薬開始から解熱するまでの日数

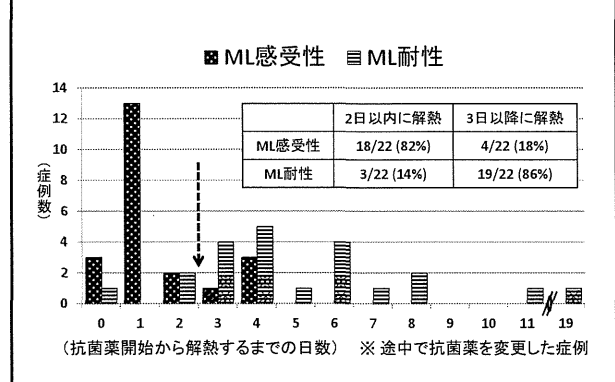


図5 発熱から解熱するまでの日数

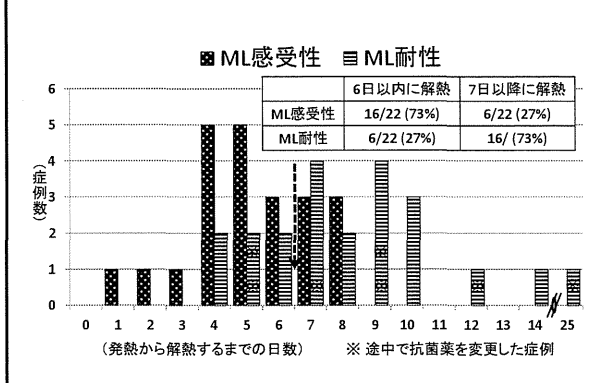
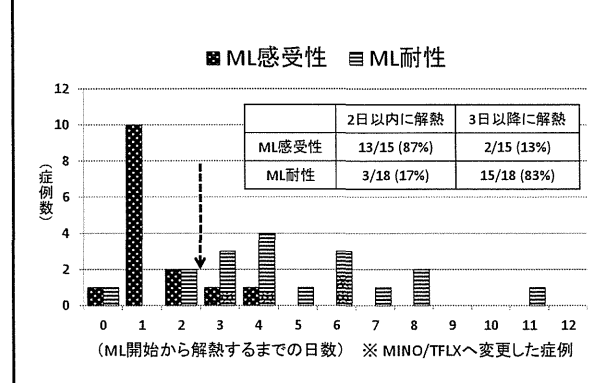


図6 ML(CAM, AZM)開始から解熱するまでの日数



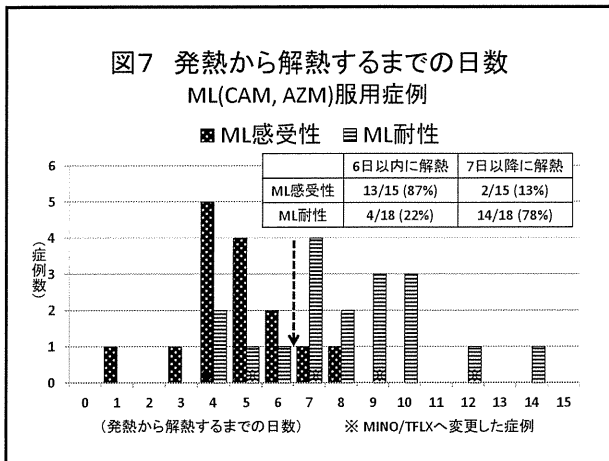


表1 マクロライド感受性菌と耐性菌の検出

	ML感受性	ML耐性	P		ML感受性	ML耐性	P
	42	37			42	10	
外来	36 (61.0%)	23 (59.0%)	0.0155*	外来	36 (85.7%)	6 (14.3%)	0.0831
入院	6 (9.0%)	14 (70.0%)		入院	6 (60.0%)	4 (40.0%)	
クリニック	27 (90.0%)	3 (10.0%)	<0.0001*	クリニック	27 (90.0%)	3 (10.0%)	0.0487*
病院	15 (30.6%)	34 (69.4%)		病院	15 (68.2%)	7 (31.8%)	
旭川	17 (100.0%)	0 (0.0%)		旭川	17 (100.0%)	0 (0.0%)	
岩見沢	1 (100.0%)	0 (0.0%)		岩見沢	1 (100.0%)	0 (0.0%)	
釧路	0 (0.0%)	27 (100.0%)		江別	1 (100.0%)	0 (0.0%)	
江別	1 (100.0%)	0 (0.0%)	<0.0001*	札幌	13 (59.1%)	9 (40.9%)	0.0054*
札幌	13 (59.1%)	9 (40.9%)		室蘭	6 (100.0%)	0 (0.0%)	
室蘭	6 (100.0%)	0 (0.0%)		千歳	3 (100.0%)	0 (0.0%)	
千歳	3 (100.0%)	0 (0.0%)		帯広	1 (50.0%)	1 (50.0%)	
帯広	1 (50.0%)	1 (50.0%)					

(釧路市を除く)
検定はカイ2乗検定

表2 患者背景

		ML感受性	ML耐性	P
患者数		22	22	
年齢(歳)	平均±標準偏差	9.1 ± 3.0	8.9 ± 3.1	0.8448
	範囲	3 - 14	4 - 15	
性別	女性患者数 (%)	13 (59.1%)	11 (50.0%)	0.5445
	男性患者数 (%)	9 (40.9%)	11 (50.0%)	
コピー数(Rx)	平均±標準偏差	1535 ± 4078	1391 ± 2423	0.8879
	範囲	1 - 16615	3 - 10591	
外来/入院別	外来患者数 (%)	18 (81.8%)	12 (54.6%)	0.0493*
	入院患者数 (%)	4 (18.2%)	10 (45.4%)	
発熱から治療開始までの日数	平均±標準偏差	3.7 ± 2.1	3.3 ± 2.2	0.5325
	範囲	0 - 7	0 - 6	
最初に選択した抗菌薬	ML (CAM, AZM)	15 (68.2%)	18 (81.8%)	
	MINO	5 (22.7%)	0 (0.0%)	0.0513
	TLX	2 (9.1%)	4 (18.2%)	

表3 抗菌薬開始日から解熱までの日数に関する各種因子(Cox回帰分析による多変量解析)

独立因子	基準	ハザード比	(95%信頼区間)	P
年齢	1歳当り	0.92	(0.79-1.06)	0.2595
性別	女性	0.82	(0.40-1.63)	0.5766
コピー数	1コピー当り	1.0	(1.00-1.00)	0.3059
外来・入院*	入院	3.36	(1.40-8.91)	0.0058*
発症～抗菌薬開始日	1日当り	2.98	(0.76-12.12)	0.1711
最初の抗菌薬の選択				
MINO**	TLX	16.1	(2.44-123.34)	0.0037*
ML***	TLX	4.7	(1.53-16.74)	0.0060*
抗菌薬変更の有無	変更無し	2.4	(0.62-9.38)	0.2007
ML耐性の有無****	ML耐性有	5.5	(2.17-14.90)	0.0003*

*入院患者に比べて外来患者では解熱する確率が3.36倍高い。
**TLXに比べてMINOでは解熱する確率が16.1倍高い。
***TLXに比べてMLでは解熱する確率が4.7倍高い。
****ML耐性有に比べてML耐性無では解熱する確率が5.5倍高い。

表4 マイコプラズマ抗原迅速検査(A社)と遺伝子検査

	遺伝子検査 陽性	遺伝子検査 陰性	
迅速検査陽性	13	12	陽性一致率 52% (13/25)
迅速検査陰性	24	189	陰性一致率 75% (189/213)
	感度 35% (13/37)	特異度 94% (189/201)	合計238検体

厚生労働科学研究費補助金（新興再興新型インフルエンザ等研究事業）

分担研究報告書

国際的な感染症情報の収集、分析、提供機能およびわが国の感染症サーベイランスシステムの改善・強化に関する研究

マイコプラズマサーベイランスシステムの改善に関する研究

研究分担者 国立感染症研究所・細菌第二部 堀野敦子

研究協力者 国立感染症研究所・細菌第二部 見理 剛

高知県衛生研究所 松本一繁、藤戸亜紀

神奈川県衛生研究所 大屋日登美

研究要旨

Mycoplasma pneumoniae は *Mycoplasma* 属の細菌で、細胞壁を持たず、宿主に依存して生存する自律増殖可能な最小クラスの細菌である。*M. pneumoniae* はヒトに感染して、肺炎や気管支炎を起こす。マイコプラズマ肺炎は第五類感染症に指定されており、全国の基幹定点から報告がなされている。このマイコプラズマ肺炎は、高熱、特徴的な肺炎像のほかに長引く乾性の咳が特徴である。マイコプラズマ肺炎は欧州で 2010-2011 年にかけて大きな流行が報告されたが、日本国内では 2011 年の夏頃より近年にない大きな流行が報告された。2013 年 12 月時点で報告数は平年並みの報告数となり流行は終息したと考えられる。

H25 年度の本分担研究では、継続課題である *p1* 遺伝子による *M. pneumoniae* の遺伝子型別の検討を引き続き行った。本研究では地方衛生研究所で LAMP 法により *M. pneumoniae* 陽性となった検体について国立感染症研究所で *p1* 遺伝子型別を行っている。*p1* 遺伝子型別法は *M. pneumoniae* がヒトの呼吸器上皮細胞に接着する際に必須であるタンパク質、P1 の遺伝子型の違いにより菌を型別する方法である。P1 タンパク質には抗原性があることから、この型別法では抗原性の違いをみることができると考えられる。*p1* 遺伝子型別法による型別の結果、これまでにマイコプラズマ肺炎の流行と流行時に検出される *M. pneumoniae* の遺伝子型の変遷には相関があるという可能性が示唆されている。本分担研究期間中に発生した 2011-2012 年のマイコプラズマ肺炎の流行により、地方衛生研究所から送付される *M. pneumoniae* 陽性の検体も多く、まとまった数の検体の解析を行うことが可能であった。加えて 2011-2012 年の流行前から *M. pneumoniae* の遺伝子型別を継続し

て行ったことにより、流行と遺伝子型の相関の可能性について検討を行うことができると考えられた。2005年頃までに国内で検出された *M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子型別状況をみると、Subtype1 と Subtype 2 が約 10 年周期で交互に優位に検出される現象が観察されていた。2005 年時点で Subtype 1 優位であったことより 2006 年以降は Subtype 2 型優位になると予想されたが、本研究期間内の分離菌では Subtype 2 はほとんど検出されず Subtype 1 と Variant 2a, Variant2c の三つの菌型が占めていた。また、これまで国内ではほとんど報告がなかった Variant 2b が、この研究では H23 年 10 月にはじめて検出され、その後も少数ではあるが継続して検出されている。2011-2012 年の流行時には、マイコプラズマ肺炎の流行により検体数が増加するに従い、Subtype1 の検出数が増加した。一方、他の型の検出数はある一定の数を保っていた。この結果から 2011-2012 年の流行は Subtype 1 によるものと考えられる。流行終息後も *p1* 遺伝子型の検討を行っているが、流行が終わると検体数が激減するため、検体数を確保することが難しくなっている。そのなかで解析可能であった *M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子型は全て subtype1 であり、2011-2012 年の流行時の菌型を維持している。この菌型に変化が生じた時に次の流行が起きる可能性がある。モニタリングを継続して次の流行に備える必要があると考える。

A.研究目的

これまで本分担研究では地方衛生研究所と共同研究で、長引く乾性の咳嗽を呈する患者由来の鼻咽頭スワブを検体として *M. pneumoniae* の検出を LAMP 法で試み、陽性となった検体について国立感染症研究所・細菌第二部で *p1* 遺伝子型別を行ってきた。この研究は、2011 年に始まったマイコプラズマ肺炎の流行前から開始しており、流行期間を通じて検体を収集している。さらに流行後にも検体の収集を継続し、流行前から流行後までの期間を通じて型別された *M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子型について解析することを目的とした。

B.研究方法

検体は長引く乾性の咳嗽症状を呈する患者由来の鼻咽頭スワブとした。これらは協力研究機関である各地方衛生研究所へ送付された。地方衛生研究所では鼻咽頭スワブから抽出したゲノム DNA を鋳型として用い LAMP 法で *M. pneumoniae* の検出を試みた。

LAMP 法で *M. pneumoniae* 陽性になった検体由来のゲノム DNA は感染研・細菌第二部に送付され *p1* 遺伝子型別を行った。この方法では *M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子配列上に 2 箇所存在する多型部位の配列の違いに基づき遺伝子型を決定する。この方法は *M. pneumoniae* の抗原性に関与するタンパク質である P1 の遺伝子の違いに基づく型別であり、抗原性の違いを見ることができると考えられる。現在までのところ、日本では

Subtype 1, Subtype 2, Variant 2a, Variant 2b および Variant 2c の 5 種類の *p1* 遺伝子型が報告されている。手法は Nested PCR RFLP 法を用いた。PCR 増幅産物を制限酵素 *HaeIII* で消化し、2%アガロースゲル電気泳動で切断断片のパターンを確認した。

(倫理面への配慮)

本研究では患者の個人情報を取り扱っておらず倫理審査を行う必要のある研究は行っていない。

C.研究結果

日本では 2011-2012 年にかけてマイコプラズマ肺炎の大流行が発生し、*M. pneumoniae* 陽性の検体を例年に較べて多く得ることができた。流行が終息する前の 2012 年までに収集された *M. pneumoniae* 検体を *p1* 遺伝子型別した結果、Subtype 1 が 64.2%、Subtype 2 が 1.4%、Variant 2a が 11.6%、Variant 2b が 4.1%、Variant 2c が 18.7%であった。2013 年はマイコプラズマ肺炎の流行が終息し、搬入される検体数が激減した。流行時には 20-30 件程度受け付けていた検体数が流行終息後は月に数件未満となった。それらの検体の型別の結果、流行終息後の 2013 年の *p1* 遺伝子型は全てが subtype1 であった (図 1)。

研究期間を通じて最も多く検体が収集されている高知県における LAMP 法による *M. pneumoniae* の陽性率は 26.4%であった。また、本研究期間を通して LAMP 法が陽性で

あった検体の *p1* 遺伝子型別率は 71.7%であった。また、患者の最年長は 51 歳、最年少は二ヶ月であった。研究期間を通した年齢別の割合では 0-2 歳が 10.6%, 3-5 歳が 19.5%, 6-15 歳が 63.9%, 16 歳以上が 4.6%, 記載なしが 1.4%であった。流行時の 2012 年に限った年齢別の割合を見ると 0-2 歳が 10.3%, 3-5 歳が 5.6%, 6-15 歳が 78.5%, 16 歳以上が 4.2%, 記載なしが 1.4%であった。

D. 考察

マイコプラズマ検体は 2011-2012 年の流行の期間を含む 2010 年から 2012 年にかけて収集され、現在も継続して収集が行われている。マイコプラズマ肺炎の流行により検体数が増加するにつれて Subtype 1 の検出数が増加する一方で、他の遺伝子型の検出数はある一定の検出数を保ち増加しなかった。流行終息後では全てが Subtype 1 で流行時の *p1* 遺伝子型を維持していた。その他、本研究期間中の *p1* 遺伝子型別の結果で最も顕著な点は、これまで日本で Subtype 1 と交互に優位となってきた主要な型の Subtype 2 が、この時期には優位になると予想されたにもかかわらず、ほとんど検出されなかったという点である。流行期に入り検体数が増えた 2012 年の状況でも Subtype 2 は検出されなかった。国外の状況を参照すると、マイコプラズマ肺炎の流行があったフランスでは日本と同じく Subtype 1 が主要な型として検出されているが、Subtype 2 がほとんど検出されないという報告はない。他のヨーロッパ諸国においても Subtype 2 が検出されない

という報告はない。これは現在までの所、日本国内で特徴的な現象である。

日本国内における Subtype 1、Subtype 2 以外の *p1* 遺伝子型については、Variant 2a と 2c が Subtype 1 の次に主要な型となっている。検出される割合は Variant 2c が徐々に増加する一方で、Variant 2a が徐々に減少しているように見受けられる。この研究班においては 2011 年に初めて検出された Variant 2b についての報告数は少ないが、一定の割合で検出が続いている。

マイコプラズマ肺炎の流行と *p1* 遺伝子型の関係については、前述のとおり 2011 年の流行開始と共に Subtype 1 の検出のみが顕著に増加し、終息後の *M. pneumoniae* の遺伝子型が Subtype 1 であったことから本流行に関わったのは Subtype 1 であると考えられる。

p1 遺伝子型別法は *M. pneumoniae* の抗原性に関与する部位に基づく方法であり、市中のヒトマイコプラズマ血中抗体と関連があるのではないかと考えられる。現在は Subtype 1 に対する抗体を持つヒトが多いため、次には Subtype 1 以外の *p1* 遺伝子型の *M. pneumoniae* が流行する可能性がある。このため継続して *p1* 遺伝子型のモニタリングを行うことが重要と考える。*M. pneumoniae* の研究を行うにあたり、非流行期における継続した検体収集は常々問題となるところであり、安定した収集が課題となる。

E. 結論

M. pneumoniae の *p1* 遺伝子型について、2011 年から 2012 年にかけての流行期と、その流行前、流行後に型別された結果について検討を行った。

その結果、2011 年にマイコプラズマ肺炎の報告数が増加し始めてから顕著に Subtype 1 の検出数が増加した。一方でそれ以外の型の検出数は内訳には変化があるものの、ある一定数を保っていた。このことより今回の流行に関与した *M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子型は Subtype 1 であると考えられた。これまで主要な遺伝子型のひとつであった Subtype 2 は、流行時で検出数が多いにもかかわらず 2012 年にも報告されず、それ以降も検出されていない。Subtype 1 以外の主要な型としては Variant 2a と Variant 2c が占めており 2a の検出数がやや減少する一方で 2c の検出数がやや増加している。また、Variant 2b の検出数は少ないが一定の割合で検出されており、日本国内でも広がっていることが示唆された。

マイコプラズマ肺炎終息後の 2013 年は検体数が激減した。それらの *M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子型別の結果、全てが Subtype 1 であり、流行期の遺伝子型を維持していた。この型が変化し始めると次の流行が始める可能性が有り、今後も *p1* 遺伝子型のモニタリングを行うことが重要であると考え。また、Subtype 2 にかわる主要な型が Variant 2a と 2c になるのか、マイコプラズマ肺炎の大流行時には Subtype 1 が優位になるのか、

今後長期にわたって *p1* 遺伝子型のモニタリングの継続を行うことも重要であると考え

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Complete Genome Sequence of *Mycoplasma pneumoniae* Type 2a Strain 309, Isolated in Japan, Kenri T., Horino A. et al. *J. Bacteriol.* March 2012 194:1253-1254;

2) Identification of *Mycoplasma pneumoniae* type 2b variant strains in Japan, Kenri T, Ohya H, Horino A., Shibayama K, *J Med Microbiol.*, Nov;61, 1633-5, 2012

2. 学会発表

1) 2011 年のマイコプラズマ流行を考える。堀野敦子、第 39 回日本マイコプラズマ学会学術集会、2012 年 5 月、盛岡

2) Genotyping of *Mycoplasma pneumoniae p1* genes detected in Japan from 2009 to 2012, Horino A., Kenri T., Matsumoto J., Katsukawa C., Takahashi C., Taniguchi K. 19th International Organization for Mycoplasmaology (IOM), Toulouse, France, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

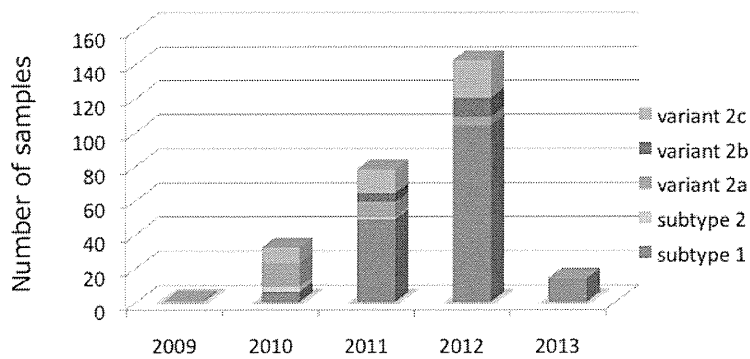
なし

3.その他

なし

図1 **2009-2013年のp1 遺伝子型の内訳**

高知から提出された検体のp1 遺伝子型別結果
2009-2013



2011年から2012年にかけてSubtype 1のみが目立って増加した。
2013年は検体数が激減し、14件全てがSubtype 1であった。