

## マクロライド耐性肺炎マイコプラズマ感染症に対する 抗菌薬の有効性に関する研究 —肺炎マイコプラズマ感染症の地域的な解析と基幹病院定点の評価—

研究分担者 石黒 信久 北海道大学病院 感染制御部  
研究協力者 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  
菊田 英明 北海道大学  
大庭 幸治 東京大学大学院 情報学環・学際情報学府  
富樫 武弘 北海道結核予防会 札幌複十字総合健診センター

### 研究要旨

【目的】①小児におけるマクロライド（ML）耐性肺炎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調査すると共に、②ML耐性肺炎マイコプラズマのサーベイランスを行い、それを経時的にフィードバックするシステムを構築することで、臨床医の抗菌薬選択に寄与することを目的とする。

【方法】①2013年7月から2015年8月までの期間、肺炎マイコプラズマによる肺炎患者の鼻咽頭ぬぐい液を採取してML耐性の有無を検査すると同時に、各種抗菌剤の治療効果を検討した。②2016年7月から2017年11月まで肺炎マイコプラズマ抗原検査あるいはLAMP法によるマイコプラズマ核酸検出検査を行ない、検査で陽性となった検体の残り液を用いてML耐性の有無を検査した。

【結果】①(1) 50名（45.9%）のML感受性肺炎マイコプラズマ肺炎患者と59名（54.1%）からML耐性肺炎マイコプラズマ肺炎患者を対象として解析を行った。ML耐性株は全て23SリボゾームRNA上にA2063G変異を有していた。(2) A2063G変異を有する肺炎マイコプラズマ株のマクロライド系抗菌薬に対するMIC90値はA2063G変異を有さない株に比べて $10^5$ 倍以上高値であったが、MINOとTFLXに対するMIC90値はA2063G変異を有さない株と差異はなかった。(3) ML耐性肺炎マイコプラズマ感染症に抗菌薬開始から解熱までの日数を比較すると、MINO使用群で抗菌薬開始日から解熱までの日数が有意に短かったが、その他の3剤（AZM、CAM、TFLX）使用群では抗菌薬開始日から解熱までの日数に有意差はなかった。(4) 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、抗菌薬による治療開始後2日以内に解熱する症例の78%はML感受性群であり、発熱が3日以上持続する症例の85%はML耐性群であった。②(1) 合計338名の患者から検体を採取し222名（65.7%）の検体より肺炎マイコプラズマが検出された。222名中98名（44.1%）から採取された検体からML耐性肺炎マイコプラズマが検出され、残りの124名（55.9%）から採取された検体からML感受性肺炎マイコプラズマが検出された。(2) 地域による偏りが存在した。

【結語】①ML耐性マイコプラズマによる肺炎に対してはMINOが有効であるが、他の3剤（AZM、CAM、TFLX）の効果は限定的であった。②ML耐性肺炎マイコプラズマの検出頻度には地域による偏りがあることが確認された。ML耐性肺炎マイコプラズマのサーベイランスの臨床的有用性が高いと思われた。

## A. 研究目的

近年、マクロライド (ML) 耐性肺炎マイコプラズマの出現が大きな問題となっている。ML 耐性肺炎マイコプラズマによる感染症の治療にミノサイクリン (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。

本研究では小児における ML 耐性肺炎マイコプラズマ感染症の実態を明らかにするとともに、ML 感受性及び耐性肺炎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調査することに加えて、ML 耐性肺炎マイコプラズマのサーベイランスを行い、それを経時的にフィードバックするシステムを構築することで、臨床医の抗菌薬選択に寄与することを目的とする。

## B. 研究方法

### ①マクロライド耐性肺炎マイコプラズマ感染症に対する抗菌薬の有効性に関する研究

#### 1. 研究の種類・デザイン

前向き観察研究

#### 2. 対象患者

2013年7月から2015年8月までに、道内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の所見があり、本研究の参加にあたり、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。

#### 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。1本の検体を用いて「遺伝子検査方法」に示す測定を行い、1本の検体を用い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 (J. Clin. Microbiol. 2008, 46(9): 3116)。23S rRNA 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. 肺炎マイコプラズマの分離と抗菌薬感受性

Hayflick 培地を用いて肺炎マイコプラズマを分離して (Tex Rep Biol Med 1965. 23: Suppl 1: 285+)、微量液体培地希釈法により抗菌薬に対する MIC (最小発育阻止濃度) 値を測定した (Antimicrob Agents Chemother 2004. 48: 4624-4630)。

## 6. 被験者の診療情報

被験者への調査票と主治医への調査票から診療情報を入手する。

## 7. 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。

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。

## 8. 倫理的配慮

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)。

### ②肺炎マイコプラズマ感染症の地域的な解析と基幹病院定点の評価

#### 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

2016年7月以降、道内の医療機関に通院または入院した18歳以下のマイコプラズマ感染症（疑いも含む）患者のうち、マイコプラズマ抗原検査あるいは LAMP 法によるマイコプラズマ核酸検出検査を行ない、本研究の参加にあたり、患者本人（代諾者を含む）の自由意思による同意が得られた患者を対象とする。

#### 3. 検体採取方法

マイコプラズマ抗原検査あるいは LAMP 法によるマイコプラズマ核酸検出検査は、各検査キットの添付文書に則り実施し、検査で陽性となった検体の残り液を凍結・保存する。これらの残り液を北大小児科の研究室に集めて、以下に示す測定を行う。

#### 4. 遺伝子検査方法

マイコプラズマ抗原検査の残り液から核酸を抽出し、real-time PCR法にてマイコプラズマ遺伝子を検出する (J. Clin. Microbiol. 2008, 46(9): 3116)。ML耐性遺伝子の検出はMatsuokaらの報告に従った (Antimicrob Agents Chemother. 48: 4624, 2004)。

#### 5. 被験者の診療情報

被験者への調査票から情報を入手する。

#### 6. 統計学的解析

マクロライド耐性率について、地区別に、外来患者/入院患者の区別、患者年齢、を調整した標準化割合ならびにその95%信頼区間を年ごとに算出する。標準集団は全体集団における分布とする。また、マクロライド耐性遺伝子の有無を従属変数、外来患者/入院患者の区別、患者年齢、患者性別、患者が居住している地区、調査年、検体提出1週間以内にマクロライド系抗菌薬服用の有無を独立変数としてロジスティック回帰分析を行う。

#### 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014-0269, 自016-0097)。

### C. 研究結果

#### ①マクロライド耐性肺炎マイコプラズマ感染症に対する抗菌薬の有効性に関する研究

##### 1. 解析の対象となった肺炎マイコプラズマ肺炎患者

50名 (45.9%) のML感受性肺炎マイコプラズマ肺炎患者と59名 (54.1%) からML耐性肺炎マイコプラズマ肺炎患者を対象として解析を行った。ML耐性株は全て23SリボゾームRNA上にA2063G変異を有していた。

##### 2. 分離された肺炎マイコプラズマ株のML感受性

A2063G変異を有さない肺炎マイコプラズマ株のマクロライド系抗菌薬のMIC90値は低値であっ

たが、A2063G変異を有する肺炎マイコプラズマ株のマクロライド系抗菌薬のMIC90値はいずれも (A2063G変異を有さない肺炎マイコプラズマ株と比べて)  $10^5$ 倍以上高値であった。MINOとTFLXについてはA2063G変異がある株とA2063G変異がない株との間にMIC90値の差異はなかった。

#### 3. 肺炎マイコプラズマ患者の背景および抗菌薬開始から解熱までの日数

解析の対象となった109名 (ML感受性群50名、ML耐性群59名) の患者背景を表2に記載した。抗菌薬開始日から解熱までの日数に關与する各種因子をCox回帰分析による多変量解析にて解析したところ、①入院の有無、②最初に選択した抗菌薬、③ML耐性遺伝子が影響を与えることが判明した (表3)。抗菌薬開始から解熱するまでの時間は、最初に選択する抗菌薬によって大きく異なる (図1)。

ML耐性群 (59症例) に限定したサブ解析を行うと、①入院の有無、②最初に選択した抗菌薬が抗菌薬開始日から解熱までの日数に影響を与えた。AZM群に比べてMINO群では解熱する確率が37.2倍高く、CAM群に比べてMINO群では解熱する確率が56倍高く、TFLX群に比べてMINO群では解熱する確率が77倍高かった。

ML感受性群とML耐性群における、抗菌薬開始から解熱までの日数を抗菌薬別に解析したところ、ML耐性群にML系抗菌薬 (CAM、AZM) を使用した場合、ML感受性群に比べて発熱が3日間程度長引くことが判明した (図1、2)。MINOとTFLXを使用した場合、ML感受性群とML耐性群には有熱期間の有意差はなかった (図2)。

#### ②肺炎マイコプラズマ感染症の地域的な解析と基幹病院定点の評価

##### 1. ML耐性肺炎マイコプラズマの検出頻度

2016年7月より2017年11月までに合計338名の患者から検体を採取し、222名 (65.7%) の検体より肺炎マイコプラズマが検出された。222名中98名 (44.1%) から採取された検体からML耐性肺炎マイコプラズマが検出され、残りの124名 (55.9%) から採取された検体からML感受性肺炎マイコプラズマが検出された。

## 2. ML耐性率の地域差

旭川市では17検体中2検体(11.8%)、江別市では24検体中9検体(37.5%)、岩見沢市では16検体中11検体(68.8%)、帯広市では64検体中39検体(60.9%)、札幌市では76検体中33検体(43.4%)がML耐性であり、札幌市内の区によってML耐性は11.1~100.0%までの変動があった。

## D. 考察

### 1. ML感受性およびML耐性肺炎マイコプラズマによる肺炎に有効な抗菌薬

ML感受性肺炎マイコプラズマ感染症にAZM、CAM、MINO、TFLXを使用した場合の抗菌薬開始から解熱までの日数を比較すると、全体としては4種類の抗菌薬間に有意差を認めるものの(図1)、2種類の薬剤を個々に比較した場合には有意な違いはなかった。

一方、ML耐性肺炎マイコプラズマ感染症にAZM、CAM、MINO、TFLXを使用した場合の抗菌薬開始から解熱までの日数を比較した場合には、MINO使用群で抗菌薬開始日から解熱までの日数が有意に短かった(図1)。その他の3剤(AZM、CAM、TFLX)使用群については、抗菌薬開始日から解熱までの日数に有意差はなかった。

MINOとTFLXのMIC90値はML感受性肺炎マイコプラズマとML耐性肺炎マイコプラズマで差異がないが、ML耐性肺炎マイコプラズマに対する臨床効果は両薬剤で明らかに異なる。MINOに比べてTFLXの半減期が長いこと、あるいは肺組織における移行率に違いがあるため等の理由が考えられる。

### 2. ML耐性肺炎マイコプラズマによる肺炎に対する治療の選択

肺炎マイコプラズマによる肺炎をCAMやAZMなどのマクロライド系抗菌薬で治療開始した場合、治療開始後2-3日以内に解熱しない場合、8歳以上の患者であればMINOの使用も選択肢となり得る。8歳未満の肺炎マイコプラズマによる肺炎患者で発熱が遷延している場合には、短期間のステロイド剤使用も検討されて良いかもしれない。

### 3. ML耐性肺炎マイコプラズマの検出頻度の地域差

全体の集計では、ML耐性株の占める割合は44.1%(98/222)であったが、ML耐性率には地域による大きな偏りが存在した。今回の研究結果は過去の結果と一致する(Jpn J Infect Dis. 2016 May 20; 69(3): 186-190)。

感染症発生動向調査においては、マイコプラズマ肺炎は基幹定点把握疾患であり、道内23か所の基幹定点医療機関から318例(2017年)の報告がなされている。ただし、感染症発生動向調査においては、マクロライド耐性のサーベイランスが行われていないことから、今回の研究は感染症発生動向調査を補填する点で有用性があると考えられる。今後、感染症発生動向調査にマクロライド耐性の結果を取り入れるかどうかについては、費用対効果の観点の検討が必要である。

### 4. 薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン

薬剤耐性(AMR)対策アクションプランの成果目標に「マクロライド系薬の人口千人当たりの一日使用量を2013年の水準から50%削減する」ことが挙げられている。ML耐性率には大きな地域差があるため、自施設の周辺のマクロライド感受性/耐性率を知った上で、診療を行うことが重要である。道内各地区のマクロライド耐性率の集計をネット上で閲覧できるシステムを構築したい。

## E. 結論

ML耐性肺炎マイコプラズマ感染症にAZM、CAM、MINO、TFLXを使用した場合の抗菌薬開始から解熱までの日数を比較すると、MINO使用群で抗菌薬開始日から解熱までの日数が有意に短かったが、その他の3剤(AZM、CAM、TFLX)については、抗菌薬開始日から解熱までの日数に有意差はなかった。

ML耐性肺炎マイコプラズマの検出頻度には地域による偏りがあることが再確認された。ML耐性肺炎マイコプラズマのサーベイランスの臨床的有用性が高いと思われた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ishiguro N, Koseki N, Kaiho M, Kikuta H, Togashi T, Watanabe T, Ariga T and Hokkaido Pediatric Respiratory Infection Study Group. (2015) "Sensitivity and Specificity of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of Mycoplasma pneumoniae from Nasopharyngeal Swab Samples Compared with those of Real-time PCR." *Clinical Laboratory* (2015) 61(5-6): 603-606.
- 2) Ishiguro N, Koseki N, Kaiho M, Kikuta H, Togashi T, Oba K, Morita K, Nagano N, Nakanishi M, Hazama K, Watanabe T, Sasaki S, Horino A, Kenri T, Ariga T; Hokkaido Pediatric Respiratory Infection Study Group. Regional Differences in Rates of Macrolide-Resistant Mycoplasma pneumoniae in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2016 May 20; 69(3): 186-190.
- 3) Ishiguro N, Koseki N, Kaiho M, Ariga T, Kikuta H, Togashi T, Oba K, Morita K, Nagano N, Nakanishi M, Hara K, Hazama K, Watanabe T, Yamanaka T, Sasaki S, Furuyama H, Shibata M, Shida S, Ishizaka A, Tabata Y, Aoyagi H, Naito H, Yoshioka M, Horino A, Kenri T; Hokkaido Pediatric Respiratory Infection Study Group. Therapeutic efficacy of azithromycin, clarithromycin, minocycline and tosufloxacin against macrolide-resistant and macrolide-sensitive Mycoplasma pneumoniae pneumonia in pediatric patients. *PLoS One.* 2017 Mar 13;

12(3): e0173635.

- 4) 石黒信久. マイコプラズマ感染症-再流行に備えて～薬剤耐性の現状と抗菌薬治療～ *小児科* 2015; 56(6): 785-792

### 2. 学会発表

- 1) 石黒信久, 小関直子, 有賀 正, 菊田英明, 渡辺 徹, 富樫武弘. マイコプラズマのマクロライド耐性率は地域によって大きく異なる. 第46回日本小児感染症学会総会・学術集会 (2014/10/18-19)
- 2) 石黒信久, 小関直子, 有賀 正, 菊田英明, 渡辺 徹, 富樫武弘. マクロライド感受性及び耐性マイコプラズマの治療効果に関する前向き観察研究. 第46回日本小児感染症学会総会・学術集会 (2014/10/18-19)
- 3) 石黒信久, 中川直子, 海方美紀, 有賀 正, 菊田英明, 渡辺 徹, 富樫武弘, 堀野敦子. マイコプラズマのマクロライド耐性率の地域差およびマクロライド耐性マイコプラズマの治療効果に関する研究. 第89回日本感染症学会総会・学術集会 (2015/4/16-17)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

### ※謝辞:

本研究にご協力頂いた道内33医療機関の先生方に厚く御礼申し上げます。

表1. 患者背景

		ML感受性	ML耐性	P
患者数		50	59	
年齢(歳)	平均 ± 標準偏差	9.2 ± 3.3	9.0 ± 3.2	0.7745
	範囲	2 - 15	3 - 17	
性別	女性患者数(%)	21 (42.0%)	26 (44.1%)	0.8280
	男性患者数(%)	29 (58.0%)	33 (55.9%)	
クリニック/病院別	クリニック受診患者数(%)	36 (72.0%)	1 (1.7%)	<0.0001*
	病院受診患者数(%)	14 (28.0%)	58 (98.3%)	
外来/入院別	外来患者数(%)	35 (70.0%)	20 (33.9%)	0.0002*
	入院患者数(%)	15 (30.0%)	39 (66.1%)	
発熱から治療開始までの日数	平均 ± 標準偏差	3.6 ± 2.1	3.1 ± 1.8	0.2056
	範囲	0 - 8	0 - 6	
最初に選択した抗菌薬	CAM	26 (52.0%)	29 (49.2%)	0.2217
	AZM	11 (22.0%)	18 (30.5%)	
	MINO	9 (18.0%)	4 (6.8%)	
	TFLX	4 (4.0%)	8 (13.5%)	

PLoS One. 2017 Mar 13;12(3):e0173635.

表2. 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	1.00	(0.93-1.07)	0.9896
性別	女性	0.80	(0.53-1.21)	0.2810
外来・入院*	入院	2.08	(1.28-3.40)	0.0031*
発症～抗菌薬開始日	1日当り	1.12	(0.99-1.27)	0.0621
最初の抗菌薬の選択				
AZM	CAM	1.37	(0.82-2.24)	0.2279
MINO**	AZM	2.83	(1.17-6.74)	0.0215*
MINO	CAM	3.87	(1.64-8.84)	0.0024*
AZM	TFLX	2.24	(1.10-4.88)	0.0256*
CAM	TFLX	1.64	(0.84-3.50)	0.1554
MINO	TFLX	6.34	(2.30-17.84)	0.0004*
抗菌薬変更の有無	変更無し	0.71	(0.40-1.22)	0.2273
ML耐性の有無***	ML耐性有	2.43	(1.56-3.80)	<0.0001*

\*入院に比べて外来では解熱する確率が2.08倍高い。 PLoS One. 2017 Mar 13;12(3):e0173635.

\*\*AZMに比べてMINOでは解熱する確率が2.83倍高い。

\*\*\*ML耐性有に比べてML耐性無では解熱する確率が2.43倍高い。

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)

ML耐性(59症例)に限定したサブ解析

独立因子	基準	ハザード比	(95%信頼区間)	P
年齢	1歳当り	1.00	(0.91-1.10)	0.9467
性別	女性	0.88	(0.48-1.62)	0.6772
外来・入院	入院	2.02	(1.02-3.93)	0.0404*
発症～抗菌薬開始日	1日当り	1.09	(0.91-1.31)	0.3452
最初の抗菌薬の選択				
AZM	CAM	1.51	(0.78-2.87)	0.2228
MINO	AZM	37.20	(5.02-758.89)	0.0003*
MINO	CAM	56.01	(7.74-1129.74)	<0.0001*
AZM	TFLX	2.07	(0.79-5.97)	0.1410
CAM	TFLX	1.38	(0.55-3.87)	0.5060
MINO	TFLX	77.08	(9.47-1655.99)	<0.0001*
抗菌薬変更の有無	変更無し	0.89	(0.45-1.71)	0.7350

PLoS One. 2017 Mar 13;12(3):e0173635.

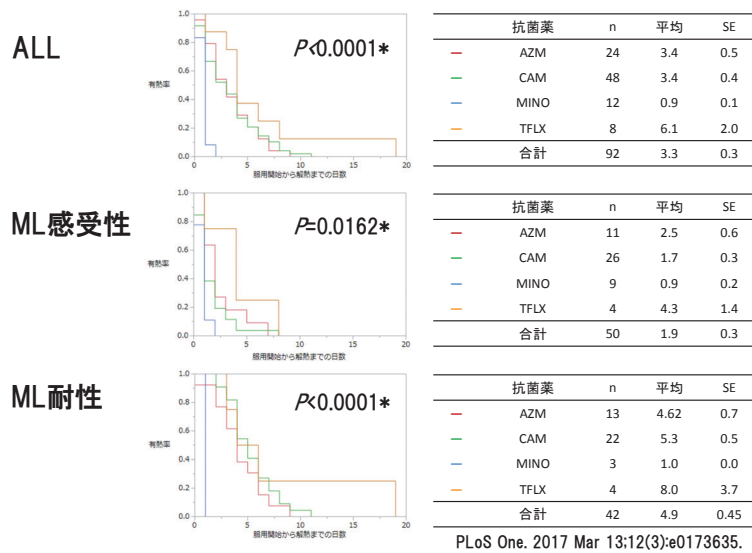


図1. 最初に選択した抗菌薬の違いによる解熱時間  
～服用開始から解熱までの日数～

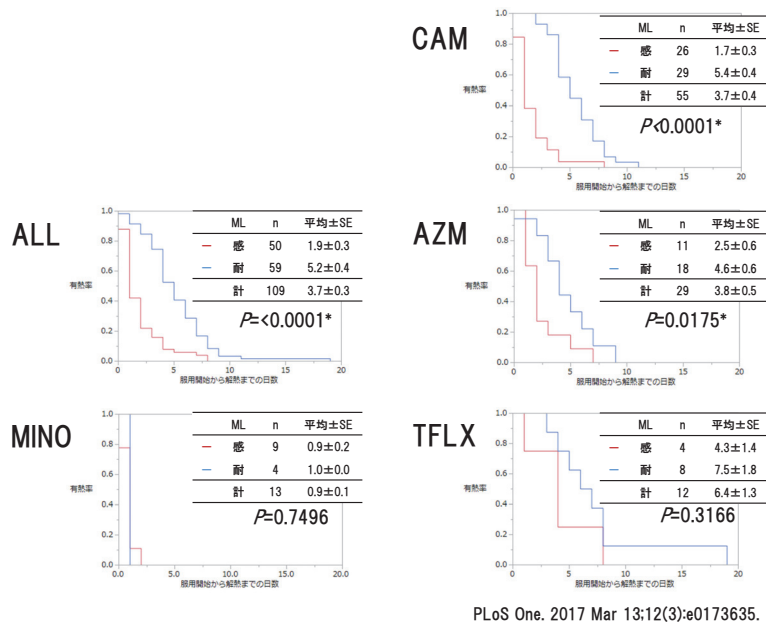


図2. ML感受性と耐性の違いによる解熱時間