

感染症発生動向調査事業

2016年度のマイコプラズマ肺炎流行期に検出された *Mycoplasma pneumoniae* のマクロライド耐性変異及び *p1* 遺伝子型の検出状況

鈴木純恵 今野貴之 柴田ちひろ 斎藤博之

1. はじめに

マイコプラズマ肺炎は風邪様の症状と発熱を主症状とし、乾いた咳が長く続くのが特徴で、主な患者は15歳以下の小児である。

原因菌である *Mycoplasma pneumoniae* は細胞壁を欠くため、一般的な細菌感染症で汎用されるβ-ラクタム系薬が無効であり、マイコプラズマによる感染症の治療にはタンパク質合成を阻害するマクロライド系薬が第一選択薬として使用されている¹⁾。しかしながら、2001年には国内でマクロライド耐性の *M. pneumoniae* が報告され、その増加が危惧されている²⁾。マクロライド系薬への耐性化は、23S ribosomal RNA のドメイン V の2,063位、2,064位及び2,617位の点変異によって起こり³⁾、地域や医療機関の規模によっても違いがあるものの、国内の臨床分離株の50%以上はマクロライド耐性と推定されている^{4,5)}。マイコプラズマ肺炎は、周期的な流行を起こすことが知られているが、国内では1990年代以降、周期性がみられなくなっていた。しかしながら、マイコプラズマ肺炎の患者報告数は2000年以降増加傾向を示し、特に2011年から2012年には全国的な大きな流行が認められた⁶⁾。秋田県では2016年から2017年にもマイコプラズマ肺炎の患者数が増加し、2012年以来の周期的流行が確認された。

マイコプラズマ肺炎の流行とマクロライド耐性 *M. pneumoniae* の増加との関連性を示唆する報告もあるが⁴⁾、これまで秋田県内の *M. pneumoniae* についてのマクロライド耐性に関する知見はほとんど得られていない。そこで、秋田県におけるマイコプラズマ肺炎流行期のマクロライド耐性 *M. pneumoniae* の検出状況を把握するため、2016年4月から2017年3月に県内の協力医療機関から提供された咽頭

ぬぐい液を用いて、*M. pneumoniae* の検出とマクロライド耐性遺伝子の解析を行った。また、*M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子の多型性をもとに分子疫学的解析を行い、秋田県内で流行した *M. pneumoniae* の遺伝的な特徴を調査した。

2. 方法

2.1 調査対象

2016年4月から2017年3月までに秋田県の北部、中央部及び南部の病原体定点医療機関各3施設（計9施設）から提供された咽頭ぬぐい液829検体を対象にした（図1）。

2.2 *M. pneumoniae* の検出

MagNA Pure LC2.0を用いてDNA抽出を行った。Winchell et al.⁷⁾の方法をもとにしたreal-time PCRにより、*M. pneumoniae* の検出を行った。

2.3 マクロライド耐性遺伝子の解析

国立感染症研究所の病原体検出マニュアル⁸⁾の方法を一部改変したnested-PCRにより、23S ribosomal RNA 遺伝子のA2063、A2064及びC2617を含む領域を増幅した。得られたPCR断片は、QIAamp PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いて精製後、商業用のシーケンス受託サービス（ファスマック社）を利用して解析を行った。

2.4 *p1* 遺伝子型別

国立感染症研究所の病原体検出マニュアル⁸⁾の方法を一部改変したnested-PCRにより *p1* 遺伝子のRepMP2/3領域とRepMP4領域を増幅後、*Hae*IIIにて制限酵素処理した。3%アガロースゲルにて電気泳動し、PCR断片の切断パターンから型別を行った。

3. 結果

real-time PCR 法により *M. pneumoniae* 陽性となったのは 829 検体中 31 検体であり、検出数は県の北部が 19 検体と最も多かった。

M. pneumoniae 陽性検体の内、マクロライド耐性の解析が可能であったのは 25 検体で、その内の 7 検体でマクロライド耐性に関わる変異が確認された（表 1）。確認された変異はすべて A2063G の変異であった。マクロライド耐性変異の検出率は、地域によって 6.7～83.3%と大きな幅があった。

p1 遺伝子型別の結果、県内において最も主要だったのは II 型であった。マクロライド耐性変異が確認された 7 検体のうち、*p1* 遺伝子型が判明したのは 6 件で I 型 4 件と II 型亜種（2a）2 件であった（表 2）。

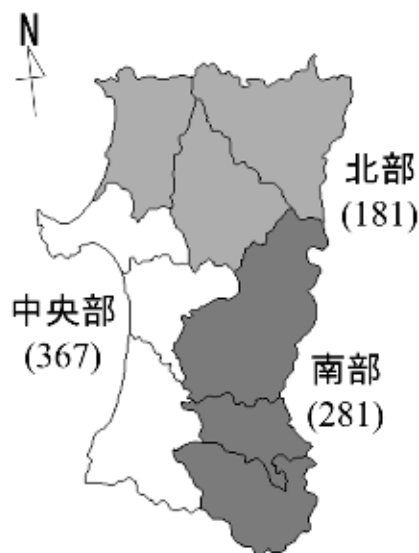


図 1 各地域から収集された検体数

表 1 マクロライド耐性変異の検出状況

地域	マクロライド耐性変異				計
	陽性	(%)	陰性	(%)	
北部	1	(6.7)	14	(93.3)	15
中央部	5	(83.3)	1	(16.7)	6
南部	1	(25.0)	3	(75.0)	4
計	7	(28.0)	18	(72.0)	25

表 2 *p1* 遺伝子型の割合

マクロライド耐性	p1遺伝子型					計
	I型	II型	II型亜種			
			2a	2b	2c	
陽性	4		2			6
陰性		12	1		3	16
ND*					1	1
計 (%)	4 (17.4)	12 (52.2)	3 (13.0)	0 (0)	4 (17.4)	23

*ND: not determined.

4. 考察

本調査における *M. pneumoniae* のマクロライド耐性変異の割合は 28.0%であり、以前に国内で推定された耐性率よりも低かった^{4,5)}。水谷ら⁹⁾は大阪府における調査で、2015 年以降マクロライド耐性 *M. pneumoniae* の検出率が低下傾向にあることを指摘している。

秋田県内の *p1* 遺伝子型は、II 型が多かったが、II 型からはマクロライド耐性変異は確認されなかった（表 2）。これまでの報告から、国内ではマクロライド耐性 *M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子型は主に I 型と考えられる^{10,11)}。

M. pneumoniae の *p1* 型はおよそ 10 年周期で切り替わることが示唆されているが¹²⁾、マクロライド耐性が増加し始めた 2000 年以降、国内の *M. pneumoniae* の主流は I 型であった。それに加え、近年、II 型は II 型亜種に代わられほとんど検出されなくなっていた。そのため、マクロライド系薬の暴露を受ける機会が少なく、マクロライド耐性変異の獲得が進んでいなかったと考えられる。*M. pneumoniae* の *p1* 型の変化とマイコプラズマ肺炎の流行との関連については不明であるが、本調査における低いマクロライド耐性率には、秋田県の *p1* 遺伝子型の検出状況が反映されたものと考えられた。

本調査では、秋田県における *M. pneumoniae* のマクロライド耐性変異及び *p1* 遺伝子型の検出状況を明らかにした。これらの結果は、今後の秋田県におけるマイコプラズマ肺炎の発生状況の解明のための基礎データとして活用が期待される。

謝辞

本調査に御協力を頂いた大館市立総合病院、北秋田市民病院、能代厚生医療センター、秋田厚生医療センター、市立秋田総合病院、由利組

合総合病院，大曲厚生医療センター，平鹿総合病院，雄勝中央病院に感謝致します。

参考文献

- 1) 日本小児科学会予防接種・感染対策委員会，他：小児呼吸器感染症診療ガイドライン 2011 追補版「小児肺炎マイコプラズマ肺炎の診断と治療に関する考え方」，2013.
- 2) Okazaki N., et al.: Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro, *Microbiol Immunol.*, **45**, 2001, 617-620.
- 3) Matsuoka M., et al.: Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan, *Antimicrob Agents Chemother.*, **48**, 2004, 4624-30.
- 4) 生方公子，他：小児におけるマクロライド高度耐性・肺炎マイコプラズマの大流行，病原微生物検出情報，**32**, 2011, 337-339.
- 5) 黒崎知道，他：1次医療機関における肺炎マイコプラズマのマクロライド耐性，病原微生物検出情報，**33**, 2012, 267-268.
- 6) 国立感染症研究所：マイコプラズマ肺炎，病原微生物検出情報，**33**, 2012, 261-2.
- 7) Winchell JM., et al.: Evaluation of three real-time PCR assays for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in an outbreak investigation, *J Clin Microbiol.*, **46**, 2008, 3116-8.
- 8) 国立感染症研究所：肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) 検査マニュアル，病原体検出マニュアル，平成23年9月.
- 9) 水谷香代子，他：大阪府におけるマクロライド耐性肺炎マイコプラズマの検出率の低下傾向，病原微生物検出情報，**37**, 2016, 183-184.
- 10) Kubota H., et al.: Molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* isolated from pediatric patients in Tokyo, Japan, *Jpn J Infect Dis.*, **68**, 2015, 76-8.
- 11) 鈴木裕，他：山形県で2004年から2013年の10年間に分離した *Mycoplasma pneumoniae* のマクロライド耐性遺伝子変異および p1 遺伝子型解析，感染症学雑誌，**89**, 2015, 16-22.
- 12) Kenri T., et al.: Genotyping analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains in Japan between 1995 and 2005: type shift phenomenon of *M. pneumoniae* clinical strains, *J Med Microbiol.*, **57**, 2008, 469-75.