

15. 薬剤耐性肺炎マイコプラズマと分子疫学に関する研究

○大屋日登美、古川一郎（神奈川県衛生研究所）

【研究目的】

マイコプラズマ肺炎の治療には、抗菌薬としてマクロライド系 (MLs)、テトラサイクリン系 (TCs) 及びニューキノロン系 (FQs) 薬剤が用いられ、第一選択薬剤として一般的に MLs が用いられる。しかし、国内の患者で MLs に高度耐性を示す MLs 耐性肺炎マイコプラズマ (MRMP: macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*) が増加していたことに伴い¹⁻²⁾、成人においては、FQs 薬剤が治療に使用されているという報告もある³⁾。小児科領域では、MLs の効果がない場合、TCs は副作用の問題があり、FQs は使用可能な薬剤が限られているため、成人領域で FQ 耐性肺炎マイコプラズマ (FRMP: fluoroquinolone-resistant *M. pneumoniae*) が出現し、小児領域に拡散することは治療に用いる薬剤がなくなるため大きな問題となる。そこで、未だ臨床から分離の報告はないが FRMP の出現状況を把握するために臨床分離株の MLs および FQs に対する薬剤感受性試験を実施した。また、FRMP 出現の可能性を探索するため、実験的に FRMP 出現をセレクション実験で確認し、その耐性機構を解析したので報告する。

【材料と方法】

1) FRMP 出現状況の把握

2015～2016 年に神奈川県内定点等の医療機関由来の咽頭ぬぐい液 140 検体から PCR を併用して分離培養によって *M. pneumoniae* を検出した。分離した 96 株中 87 株と標準株 3 株 (M129, FH, Mac) について MLs 5 薬剤 (14 員環 2 薬剤: EM, CAM、15 員環 1 薬剤: AZM、16 員環 2 薬剤: JM, RKM)、TCs 2 薬剤 (TC, MINO)、FQs 5 薬剤 (LVFX, CPFX, TFLX, SPFX, GFLX) に対する薬剤感受性試験にて最少発育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration: MIC) を調べた。MLs 耐性株は、23SrRNA 遺伝子変異を PCR-RFLP¹⁾ または塩基配列解析にて確認した。

2) FRMP の遺伝子変異の解析

供試菌株は、神奈川県内で臨床から分離された *M. pneumoniae* 感受性株を 100 株 (1998 年以前分離株 50 株、2003 年以降分離株 50 株)、標準株 3 株 (M129, FH, Mac) とした。耐性菌のセレクションに用いた FQs 3 薬剤は、レボフロキサシン (LVFX)、スパルフロキサシン (SPFX)、ガチフロキサキン (GFLX) で、薬剤濃度は 5 段階 (0.0625～16 µg/mL) とした。薬剤添加液体培地に各菌株の菌液 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL を $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL になるように接種し 37°C、40 日間好気培養した。薬剤感受性試験は、微量液体希釈法を用いた。供試薬剤は、FQs 5 薬剤 (LVFX, CPFX, TFLX, SPFX, GFLX)、TCs 2 薬剤 (TC, MINO)、MLs 1 薬剤 (AZM) とした。更に、FQs に対する耐性菌については、塩基配列解析を実施し、DNA ジャイレース関連遺伝子 (*gyrA*, *gyrB*)、トポイソメラーゼ関連遺伝子 (*parC*、

parE) 領域についてアミノ酸配列の変異の有無を確認した。

3) 薬剤耐性肺炎マイコプラズマと遺伝子型別 (P1 蛋白遺伝子型)

上記 1) の 96 株について P1 蛋白遺伝子型別を PCR-RFLP 法を用いて実施した。

【結果】

1) FRMP 出現状況の把握

今回臨床から検出された MLs 耐性株の出現状況は、87 株中 45 株が MRMP (51.7%) であった。これらの耐性株の 23SrRNA 遺伝子変異は、全て A2063G であり、FQs に対して感受性であることが示された。FQs 耐性株は、臨床分離株からは検出されなかった (表 1、2)。

表1 臨床分離株のMLs 薬剤に対するMIC* (µg/mL)

変異	株数	14員環		15員環	16員環	
		E M	CAM	AZM	J M	RKM
A2063G	45	≥256	16-≥256	4-64	4-16	0.063-1
感受性株	42	0.004-0.016	0.004-0.016	<0.00024-0.00098	0.016-0.063	0.004-0.063
M129**	1	0.004	0.004	0.00098	0.063	0.016
FH**	1	0.016	0.016	0.00098	0.063	0.063
Mac**	1	0.004	0.004	<0.00024	0.063	0.063

*最少発育阻止濃度(Minimum inhibitory concentration:MIC)

★ TC, MINOは全て感受性

**標準株：感受性株

表2 臨床分離株のFQs薬剤に対するMIC (µg/mL)

変異	株数	LVFX	CPFX	TFLX	SPFX	GFLX
A2063G	45	0.25-0.5	0.5-1	0.25-1	0.0625-0.125	0.0625-0.125
感受性株	42	0.25-1	0.25-2	0.25-1	0.0625-0.25	0.0625-0.125
M129	1	0.5	1	0.5	0.125	0.125
FH	1	0.5	1	0.25	0.125	0.125
Mac	1	0.5	1	0.25	0.0625	0.0625

★ TC, MINOは全て感受性

2) FRMP の遺伝子変異の解析

実験的に FRMP 出現をセレクション実験で確認したところ、103 株中 60 株由来の 67 株の FQ 耐性菌がセレクションされ、薬剤別のセレクション株数は、LVFX は 60 株 (58.3%)、SPFX では 6 株 (5.8%)、GFLX では 1 株 (1%) であった。薬剤の種類によって耐性株の出現頻度が異なることが示された (表 3)。

表3 FQ薬剤の耐性株セレクションの比較

親株分離年	選択薬剤	菌株数	実験由来 耐性株	(%)	発育日数
1988~2006	LVFX	103	60	58.3	31.3
	SPFX	103	6	5.8	37.3
	GFLX	103	1	1.0	22.0
計		309	67	21.7	

実験由来 FQs 耐性株 MIC は、いずれも感受性株（標準株：M129,FH,Mac）に比較して MIC 値が上昇していたが低濃度であった。また、セレクションの操作を繰り返すことによって、MIC 値が高くなる傾向があった。1st selection から徐々に MIC 値が高くなり、3rd selection では、LVFX、CPFX で 16 μ g/mL 以上の高度耐性菌が出現した。なお、MLs の AZM にはこれらの FQs 耐性株はすべて感受性であった（表 4、5）。

表4 実験由来FQ耐性株のMIC (μg/mL)

セレクション 回数	供試薬剤					
	LVFX	CPFX	TFLX	SPFX	GFLX	AZM
1 st FQ耐性株	1-4	2-8	0.5-4	0.25-1	0.125-0.25	<0.0156
2 nd FQ耐性株	2-8	4-8	0.5-8	0.25-4	0.125-2	<0.0156
3 rd FQ耐性株	2-16	4->16	1-4	0.5-4	0.125-1	<0.0156
M129	0.5	1	0.25	0.125	0.0625	<0.0156
FH	0.5	1	0.25	0.0625	0.0625	<0.0156
Mac	0.5	1	0.25	0.0625	0.0625	<0.0156

表5 実験由来FQ耐性株 (3rd selection株) のMIC (μg/mL)

菌株No.	供試薬剤					
	LVFX	CPFX	TFLX	SPFX	GFLX	AZM
1. L-12	4	4	2	1	0.5	<0.0156
2. L-57	4	8	2	4	1	<0.0156
3. L-64	8	8	4	1	1	<0.0156
4. L-72	8	16	4	1	1	<0.0156
5. S-12	8	8	2	4	1	<0.0156
6. S-76	16	>16	4	4	1	<0.0156
7. G-12	8	>16	4	0.5	1	<0.0156
8. M129	0.5	1	0.25	0.125	0.0625	<0.0156

実験由来 FQ 耐性株(3rd selection 株) のアミノ酸変異を表 6 に示した。実験由来 FQ 耐性株 7 株について、*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* 領域のアミノ酸配列の変異を確認した。その結果、*gyrA* 変異株が 4 株、*parC* 変異株が 5 株(確認中 1 株)、*gyrB* 変異株が 1 株であった。*gyrA*, *parC* 両方に変異があった株が 3 株、*gyrB*, *parC* 両方にアミノ酸変異が確認されたものが 1 株であった。

このうち、*gyrA* 変異株の 4 株中 2 株 (L-72,S-76) は、D99N のアミノ酸変異株で既報⁴⁾ と同じ変異が確認された。他の 2 株 (L-12,L-64) は、各々 D99A, D99H の変異株で未報告の変異株であった。*gyrB* 変異株の 1 株も未報告の変異株 (E483D) であった。*parC* 変異株 5 株中 3 株 (L-57,S-12,S-76) が既報⁴⁾ の G81C であり、残り 2 株 (L-64,L-72) は A83V と D87Y が各々 1 株で未報告の変異株であった。また、GFLX でセレクションした耐性株 (G-12) については、薬剤感受性試験で耐性であることを確認した(表 5)が、既報⁴⁾ の領域におけるアミノ酸変異はみられなかった。

表6 実験由来FQ耐性株(3rd selection株) のアミノ酸変異

菌株No.	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>
1. L-12	D99A	—	確認中	—
2. L-57	—	E483D	G81C	—
3. L-64	D99H	—	A83V	—
4. L-72	D99N	—	D87Y	—
5. S-12	—	—	G81C	—
6. S-76	D99N	—	G81C	—
7. G-12	—	—	—	—
8. M129	None	None	None	None

3) 薬剤耐性肺炎マイコプラズマと遺伝子型別 (P1 蛋白遺伝子型)

2015～2016 年臨床分離株 96 株中 1 型が 58 株(60.4 %)、2 型が 10 株(10.4%)、2c 型が 23 株(24.0 %)、新型が 5 株(5.2%)であった。2015～2016 年の分離株の P1 蛋白遺伝子型は、これまでの 10 年間に比較すると 1 型は変化なく、2 型亜種の 2c 型が増加し、新型が出現していた。なお、MLs 耐性株は 1 型と新型に属していた。

【考察と今後の課題】

本研究成果により現在のところ臨床分離株に FQ 耐性 *M. pneumoniae* の出現がないことが確認された。また、MRMP の出現状況は、臨床分離株の約 50%が MRMP で、すべて 23SrRNA 耐性遺伝子変異が A2063G であった。耐性菌の出現状況については、今後も継続的な動向把握と監視が重要であると思われた。

FQs 耐性 *M. pneumoniae* のセレクション実験結果から、治療に用いる薬剤の使用状況によっては臨床で FQs 耐性菌が出現する可能性があることが示された。今後の適切な薬剤使用が望まれる。また、FQs 耐性菌の特徴としては、*gyrA*、*gyrB*、*parC* 領域のアミノ酸配列の変異があることを確認した。これらの変異株は、フランスでの FQs 耐性菌のセレクション実験による耐性菌のアミノ酸変異と同様のものと未報告のアミノ酸変異をもつ耐性株であった。

また、*M. pneumoniae* 薬剤耐性機構との関与は不明であるが、病原性に関与する細胞吸着性タンパク質である P1 蛋白遺伝子型も変異を起こし、新しいタイプが出現してきていることが示された。本研究成果により *M. pneumoniae* において FQ 薬剤耐性化の可能性および P1 蛋白遺伝子型の変化が示されたことから、今後、これらの耐性株・変異株を今後詳細に解析し、それらの結果を *M. pneumoniae* 薬剤耐性機構の解明や新しい耐性菌・変異株の検出法開発に繋げ、さらに将来的には創薬の一助になればと思う。

【参考文献】

1. Matsuoka M, Narita M, Okazaki N, Ohya H, Yamazaki T, Ouchi K, Suzuki I, Andoh T, Kenri T, Sasaki Y, Horino A, Shintani M, Arakawa Y, Sasaki T. Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:4624–30. 2004
2. Morozumi M, Iwata S, Hasegawa K, et al. Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in pediatric patients with community-acquired pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:348–50. 2008
3. Principi N, Esposito S. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*: its role in respiratory infection. *J Antimicrob Chemother.* 68:506–11. 2013
4. Gruson D, Pereyre S, Renaudin H, Charron A, Bébéar C, Bébéar CM. In vitro development of resistance to six and four fluoroquinolones in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis*, respectively. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(3):1190-3. 2005

【謝 辞】（敬称略）

本研究にご指導・ご協力いただきました先生方、施設、機関に深謝いたします。

堀野敦子、見理剛（国立感染症研究所）、大石智洋（川崎医科大学病院）、成田光男（札幌徳洲会病院）、茅ヶ崎市立病院小児科、神奈川県感染症発生動向調査定点医療機関、神奈川県保健福祉局

【経費使途明細】

使途明細	金額
試薬購入費（BD、BBLマイコプラズマブロス基礎培地等）	201,927 円
試薬購入費（制限酵素等）	89,888 円
事務用消耗品（チューブファイル等）	6,630 円
事務費（振込手数料 3 回分（540 円×2 回、648 円×1 回））	1,728 円
合 計	30,0173 円