

耐性

マクロライド耐性マイコプラズマ感染症に関する研究

佐々木次雄¹⁾ 久保田眞由美¹⁾ 成田光生²⁾ 岡崎則男³⁾ 荒川宜親¹⁾

はじめに

マイコプラズマは自己増殖可能な最小の微生物で、生物学的には細菌に分類されるが、他の細菌と異なり細胞壁を欠くため多形態性を示し、ペニシリン、セフェム等の細胞壁合成阻害剤には感受性を示さない。マイコプラズマ肺炎は、*M. pneumoniae*感染者の約3～5%に起こり、細菌性感染の場合に見られる膿性の喀痰は伴わず、症状はかなり遷延して頑固な乾性咳嗽が続く特徴がある。また、発熱、頭痛、咽頭痛、悪寒、全身倦怠など通常の呼吸器感染症状以外に、下痢、嘔吐などの消火器症状が認められることが多い。*M. pneumoniae*感染患者は、小児で年齢とともに増加し、5～8歳が最も多く、15歳以上では少ない。以前、日本におけるマイコプラズマ肺炎はオリンピック開催年に流行したことより、「五輪病」とも呼ばれていたが、1984年及び1988年の流行ピークを最後に、1992年以降4年毎の大流行は見られなくなった。

マイコプラズマ肺炎起因菌である*M. pneumoniae*は、接着タンパク質P1の遺伝子配列を基にI型とII型に分類され、興味あることにI型とII型がほぼ10年周期で流行を繰り返していることが過去のデータより裏付けられている¹⁾。マイコプラズマ肺炎は臨床的にクラミジア肺炎と類似しているため、治療においては両者に有効なテトラサイクリン系やマクロライド系の抗生物質が一般に使用されているが、小児に対してはその副作用の危惧からテトラサイクリン系薬剤は第一選択剤とはならない。これまで*M. pneumoniae*臨床分離株のマクロライド耐性については国内外ともに報告はなかった。事実、1983～1998年に分離された*M. pneumoniae* 296株を調べた結果、1株も耐性菌は検出されなかった²⁾。その後、2000～2003年の臨床分離株中に複数のエリスロマイシン(EM)耐性株が認められた。本研究では、マクロライド耐性*M. pneumoniae*の耐性機構解析を目的とし、作用部位であ

Table 1. Macrolide-resistant *M. pneumoniae* strains isolated from patients and patients' information.

Strain no.	patient		antimicrobial agents	
	age	symptoms/disease	1st choice/effect*	2nd choice/effect
350	9	Pneumonia	Clindamycin/-	Clarithromycin/+
374	3	Pneumonia	unknown	unknown
375	4.5	Pneumonia	unknown	unknown
376	12	Pneumonia	Clarithromycin/-	Azithromycin/+
377	7	fever and cough	Azithromycin/+	
378	2	fever and cough	Cefditoren pivoxil/-	Azithromycin/+
379	9	Pneumonia	Clarithromycin/-	Azithromycin/-
380	11	Pneumonia	Clarithromycin/-	Minocycline/+
381	11	Pneumonia	Azithromycin/+	
382	7	Pneumonia	Rokitamycin/-	Azithromycin/-
383	5	Bronchitis	Cefaclor/-	Erythromycin/+
384	7	Pneumonia	Cefdinir, Fosmicin/-	Erythromycin/+
385	no information	Pneumonia, pleurisy	Clarithromycin/+	

* : - indicates no effect of antimicrobial agent, + indicates improvement of symptoms.

1) 国立感染症研究所, 2) 札幌鉄道病院, 3) 神奈川県衛生研究所

Table 2. Primers used for PCR amplification and sequencing of domains II and V of 23S rRNA and ribosomal proteins of L4 and L22 in *M. pneumoniae*.

PCR and primer designation	Sequence 5' to 3'	Position*	Amplicon size (bp)
Domain II of 23S rRNA MN23SDIF MN23SDIR	AGTACCGTGAGGGAAAGGTG TCCCAAGCGTTACTCATGCC	491-510 1287-1306	816 bp
Domain V of 23S rRNA MN23SDVF MN23SDVR	GCAGTGAAGAACGAGGGG GTCCTCGCTTCGGTCTCTCG	1758-1775 2664-2684	927 bp
Ribosomal protein L4 MNL4F MNL4R	AAAAGCAGCACCAGTTGTAG GGTTAGAACTGGTTTTAGCA	1231-1250 1933-1952	722 bp
Ribosomal protein L22 MNL22F MNL22R	GTACATAACGGCAAGACCTT GCAAGCCGTTGGAGTTTACT	3640-3659 4247-4266	627 bp

* : The positions of domain II and V of 23S rRNA are based on accession no. X68422 of *M. pneumoniae* gene, and those of ribosomal proteins L4 and L22 are based on accession no. AE000061 of *M. pneumoniae* M129 section 19 of 63 of the complete genome.

Table 3. MICs of macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics for *M. pneumoniae* isolated from patients and reference strains.

Strain no.	23S rRNA mutation ^a	MIC (μg/ml) ^b							
		EM	RXM	CAM	AZM	JM	RKM	CLDM	Q-D
350	A2063G	>256	>256	256	32	8	0.5	>256	1
374	A2063G	>256	>256	>256	64	8	0.5	256	0.5
375	A2063G	>256	>256	>256	32	16	0.5	256	0.5
376	A2063C	>256	>256	>256	16	64	4	32	1
377	C2617G	8	8	1	0.031	0.25	0.0625	2	0.25
378	A2063G	>256	>256	>256	64	8	0.5	256	1
379	A2063G	>256	>256	>256	64	8	0.5	256	0.5
380	A2063G	>256	>256	>256	64	8	0.5	256	0.5
381	A2063G	>256	>256	>256	64	8	0.5	256	0.5
382	A2063G	>256	>256	>256	64	8	0.5	256	1
383	A2064G	256	128	32	16	256	32	32	0.25
384	A2063G	>256	>256	>256	64	8	0.5	256	1
385	A2063G	>256	>256	>256	64	16	1	256	1
M129		0.0156	0.0156	0.0156	0.00195	0.125	0.0625	4	0.25

a : *M. pneumoniae* numbering

b : Abbreviations : EM, erythromycin ; RXM, roxythromycin ; CAM, clarithromycin ; AZM, azithromycin ; JM, josamycin ; RKM, rokitamycin ; CLDM, clindamycin ; Q-D, quinupristin-dalfopristin.

る23S rRNAのdomain II及びdomain V(ペプチジルトランスフェラーゼ領域), 23S ribosomal protein L4, L22の変異と耐性発現との関連を検討した。

材料及び方法

(1) 使用菌株

感受性標準株として*M. pneumoniae* M129, Mac, FHの3株。2000~2003年に北海道, 神奈川県, 高

知県で分離されたEM耐性*M. pneumoniae* 13株(Table 1)。EM感受性の臨床分離*M. pneumoniae*から作製したEM耐性変異株1020-EMR3, 1020, 1253, 1552, 1653の5株³⁾。

(2) 最小発育阻止濃度(MIC)

NCCLSに準拠し微量液体希釈法により行った。すなわち, 0.5%グルコース添加PPL0培地中で2段階希釈した薬剤に $10^4\sim 5$ cfu/mlの被検菌を加え

Table 4. Nucleotide substitution by point mutation of genes of ribosomal protein and 23S rRNA for macrolide-resistant *M. pneumoniae* strains and *M. pneumoniae* FH, Mac compared with *M. pneumoniae* M129.

strain no.	ribosomal protein						23S rRNA		Type of P1 gene
	position of L4		position of L22				domain II	domain V	
	162	430	62	279	341	508			
M129	C	A	C	T	C	T	-	-	I
350	C→A	A→G	-	T→C	-	T→C	-	A2063G	II
374	-	-	-	-	-	T→C	-	A2063G	I
375	-	-	-	-	-	T→C	-	A2063G	I
376	C→A	A→G	-	T→C	-	T→C	-	A2063C	II
377	C→A	A→G	-	T→C	-	T→C	-	- / C2617G	II
378	C→A	A→G	-	T→C	-	T→C	-	A2063G	II
379	C→A	A→G	-	T→C	-	T→C	-	A2063G	II
380	-	-	-	-	-	T→C	-	A2063G	I
381	-	-	-	-	-	T→C	-	A2063G	I
382	-	-	-	-	-	T→C	-	A2063G	I
383	-	-	-	-	-	T→C	-	A2064G	I
384	-	-	-	-	-	T→C	-	A2063G	I
385	-	-	-	-	-	T→C	-	A2063G	I
1020-EMR3	-	-	-	-	-	T→C	-	- / C2617G	I
1020	-	-	-	-	-	T→C	-	A2064G	I
1253	-	-	C→A	-	C→T	T→C	-	A2064G	I
1552	-	-	-	-	-	T→C	-	A2064C/ C2617A	I
1653	-	-	-	-	-	T→C	-	A2064G	I
FH	C→A	A→G	-	T→C	-	T→C	-	-	II
Mac	C→A	A→G	-	T→C	-	T→C	-	-	II

"-" indicates no mutation compared with the sequence of *M. pneumoniae* M129.

37℃にて培養。菌の増殖はグルコース分解による培地の色変化によって判定した³⁾。

(3) 23S rRNA domain II と V, ribosomal protein L4 と L22 の PCR と塩基配列

被検菌の培養液0.5mlを17,500×g, 20min遠心後、菌体をTE緩衝液20μlに懸濁し、PCR用試料とした。PCRにはTable 2に示したprimerを用い、94℃ 2 min, (94℃ 45sec, 55℃ 1 min, 72℃ 80sec) ×30cycles, 72℃ 5 minの条件で行った。増幅DNAを精製した後、Big Dye Terminator V3.1 cycle sequencing kitでシーケンス反応し、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem)にて塩基配列を行った。

結果

(1) 最小発育阻止濃度 (MIC)

2000~2003年に分離された76株のうちEM耐性を示した13株(17%)の各薬剤に対するMIC値をTable 3に示した。標準株M129ではクリンダマイシン4μg/mlを除いて全てに感受性を示した。臨床分離EM耐性株のうち、No. 377株はどの薬剤にも

弱い耐性を示した。他の臨床分離EM高度耐性菌では、16員環マクロライドよりも14, 15員環マクロライドに対して高いMIC値を示した。しかし、No.376, No.383の2株では、A2063G変異とは異なる耐性パターンを示した。

(2) 23S rRNA と ribosomal protein L4, L22 の塩基配列

23S rRNAのdomain II, V及びribosomal protein L4, L22の塩基配列を調べ、標準株M129 (X68422)と比較した(Table 4)。マクロライド抗生物質の作用部位の1つ752位を含むdomain IIにおいては、全ての耐性菌において塩基変異は認められなかった。しかし、domain Vでは全ての臨床分離EM耐性菌で塩基置換があり、13株中10株(77%)がA2063G transition変異、残り3株ではA2064G transition (No.383株), A2063C transversion (No.376株), C2617G transversion (No.377株)が1株ずつであった。なお、*in vitro*で得られたEM耐性菌では、主要変異である2063位, 2064位に加え、C2617G変異(1020-EM 3株)とC2617A変異(1552株)が確認された(Table 4)。*M. pneumoniae* 23S rRNA

シン, アジスロマイシンによって治癒した例がみられる。このことはマクロライド抗生物質が抗微生物作用の他に proinflammatory tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8 のようなサイトカイン産生を抑制するという抗炎症作用¹⁰⁻¹³⁾ もマイコプラズマ肺炎治癒の一因であることを示唆している。

文 献

- 1) SASAKI T., KENRI T., OKAZAKI N., *et al.* : Epidemiological study of *Mycoplasma pneumoniae* infections in Japan based on PCR-restriction fragment length polymorphism of the P1 cytoadhesin gene. *J. Clin. Microbiol.* 34 : 447~449, 1996
- 2) 成田光生 : 薬剤耐性マイコプラズマは普通に野生に存在する。医学のあゆみ 209 : 545~549, 2004
- 3) OKAZAKI, N., NARITA M., YAMADA S., *et al.* : Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin *in vitro*. *Microbiol. Immunol.* 45 : 617~620, 2001
- 4) VESTER B. and DOUTHWAITE S. : Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 : 1~12, 2001
- 5) NG L.-K., MARTIN I., LIU G., *et al.* : Mutation in 23S rRNA associated with macrolide resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 : 3020~3025, 2002
- 6) MALBRUNY B., NAGAI K., COQUEMONT M., *et al.* : Resistance to macrolides in clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* due to ribosomal mutations. *J. Antimicrob. Chem.* 49 : 935~939, 2002
- 7) PEREYRE S., GONZALEZ P., DE BARBEYRAC B., *et al.* : Mutations in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for acquired resistance to macrolides in *M. hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 : 3142~3150, 2002
- 8) Misyurina O. Y., Chiptsyna E. V., Finashutina Y. P., *et al.* : Mutations in a 23S rRNA gene of *Chlamydia trachomatis* associated with resistance to macrolides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 : 1347~1349, 2004
- 9) Vannuffel P., Di Giambattista M., Morgan E. A., *et al.* : Identification of a single base change in ribosomal RNA leading to erythromycin resistance. *J. Biol. Chem.* 267 : 8377~8382, 1992.
- 10) Abe, S., Nakamura H., Inoue S., *et al.* : Interleukin-8 gene repression by clarithromycin is mediated by the activator protein-1 binding site in human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22 : 51~60, 2000
- 11) Ichiyama, T., Nishikawa M., Yoshitomi T., *et al.* : Clarithromycin inhibits NF- κ B activation in human peripheral blood mononuclear cells and pulmonary epithelial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 : 44~47, 2001
- 12) Kohyama T., Takizawa H., Kawasaki S., *et al.* : Fourteen-member macrolides inhibit interleukin-8 release by human eosinophils from atopic donors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 : 907~911, 1999
- 13) Takizawa H., Desaki M., Ohitoshi T., *et al.* : Erythromycin suppresses interleukin 6 expression by human bronchial epithelial cells : a potential mechanism of its anti-inflammatory action. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 210 : 781~786, 1995