



医学検査のあゆみ-25

肺炎マイコプラズマ感染症の検査 — マクロライド耐性肺炎マイコプラズマの現状とその治療

もろ ずみ み ゆ き い わ た さとし
諸 角 美由紀：岩 田 敏
Miyuki MOROZUMI Satoshi IWATA

MRMP の耐性メカニズム、その耐性化の現況と治療について述べる。

はじめに

Mycoplasma pneumoniae (肺炎マイコプラズマ) は、市中において発症する呼吸器感染症の主要な病原細菌のひとつで、本菌による感染症は幼児期から学童期および成人若年層で多くみられる。本菌は細胞壁を持たない自己増殖可能な最小微生物であることが特徴で、発育にコレステロールや血清タンパクを必要とする。菌の分離には PPLO (Pleuropneumonia-like organisms) 培地と呼ばれる特殊な培地を用い、発育には約 1～4 週間を要する。このため、肺炎マイコプラズマ感染症の診断にはペア血清による血清診断法が専ら用いられてきた。

近年検査法の進歩に伴い、本菌に特異的な抗原や抗体を検出する迅速診断キットや PCR 法が開発され、保険収載されて、肺炎マイコプラズマ感染症の初期診断が可能となっている。しかし、それらの中には感度と特異度の点で問題も見られる。

他方、本菌に対し優れた抗菌活性を有しているのはマクロライド系薬 (ML 薬) で、長い間治療の第一選択薬であったが、使用量の増加に伴い 2000 年頃から ML 薬耐性肺炎マイコプラズマ (Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae* : MRMP) が分離され始めた¹⁾。その後 MRMP は経年的に増加し、2011 年には全国的に爆発的な流行を来した²⁾。成人肺炎例からも 2007 年頃から MRMP が分離され始めている³⁾。また、世界的にも MRMP が分離され始め、次第に問題化しつつある^{4~11)}。

本稿では、肺炎マイコプラズマ感染症の検査、

I. 肺炎マイコプラズマ感染症の検査

1. 血清学的診断

本来、マイコプラズマは細菌であるから培養検査が基本のはずであるが、培養には特殊な培地 (PPLO 培地または SP4 培地) を必要とし、培養日数も 1～4 週間を要するので、ルーチン検査としてはほとんど実施されていない。

それに替わって、本症の診断には通常血清学的診断が行われる。感染初期と 2 週間以上経過した後に採取されたペア血清を用い、本菌に対する抗体価上昇の有無を調べ判定する。PA (particle agglutination) 法、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)、CF (complement fixation) 法等が用いられ、主として IgG 抗体、IgM 抗体を検出する。単独血清では、PA は 320 倍以上、CF は 64 倍以上を示せばマイコプラズマ陽性と判定される。

2. 特異的 IgM 抗体検査

酵素免疫測定法を応用した“イムノカード[®]マイコプラズマ抗体 ((株) テイエフビー) キット”は、肺炎マイコプラズマ感染症の迅速診断を目的としてヒト血清中の本菌に対する特異的 IgM 抗体を迅速かつ簡便に検出する方法である。発症後に先ず上昇がみられる IgM 抗体を測定する方法であることから、迅速診断検査として有用性が期待されたが、感染後

長期間持続する抗体による偽陽性例の存在、あるいは発症早期には血清中に抗体が産生されずに偽陰性を示す例も少なくないことなどから、臨床上の有用性はそれほど高くない。

3. 抗原検出検査

肺炎マイコプラズマそのものの産生物を標的抗原として検出し、発症初期段階で診断可能な迅速診断法として開発されたのが“リボテスト[®]マイコプラズマ(旭化成ファーマ(株))”、および“プロラスト Myco[®]((株)LSI メディエンス)”である。

前者は、肺炎マイコプラズマのリボソームタンパク L7/L12 の特異的な領域を識別するモノクローナル抗体を用いた免疫クロマト法である。

一方、後者は肺炎マイコプラズマの DnaK タンパクに特異的なモノクローナル抗体を用いる免疫クロマト法である。

両者とも抗原を迅速に検出するので特異性が高い検査であるが、確実な陽性反応を示すには 10^4 CFU/mL 以上の菌数を要することから感度の点で問題がみられる。ちなみに、リボテストの感度と特異度はそれぞれ 57.1% と 92.2% 前後とされる。つまり感度が低いために、肺炎マイコプラズマ感染症であっても 40% 近くは偽陰性を示すということになり、実際の診断に用いる場合にはその点を踏まえて使用する必要がある。すなわち、ルールアウトの目的ではなく、ルールインの目的で使用すると有用である。

4. LAMP 法 (図 1)

肺炎マイコプラズマ感染症の診断を目的としたリアルタイム PCR 法がいくつか開発され注目されているが、中でもわが国で開発された LAMP 法 (Loopamp[®] マイコプラズマ P 検出試薬キット: 栄研化学(株)) は、既に保険収載され迅速診断法として応用されている¹²⁾。本法は肺炎マイコプラズマの *SDCI* 遺伝子に特異的な 6 領域 (5' 末端側に 3 領域、3' 末端側に 3 領域) を認識する 4 種のプライマーを用い、65°C の一定の温度下で標的遺伝子配列を高感度に効率良く増幅する方法である。約 60 分で検出でき、1 チューブ当たり 25 コピー存在すれば検出可能な感度となっている。感度と特異度が高く急性期診断に有用である。

5. リアルタイム PCR 法 (図 1)

現在、肺炎マイコプラズマを含む呼吸器系感染症の主要な細菌やウイルスを網羅的に検索できるキットがいくつか開発されている。タカラバイオ(株)、ルミネックス・ジャパン(株)、(株)理研ジェネシス、Sacace Biotechnologies 社などからである。ルミネックス・ジャパン(株)のキットは蛍光マイクロビーズアレイシステムを用いた手法で、米国では臨床診断に用いられ始めている。(株)理研ジェネシスの Fast-track Diagnostics 感染症検査キットは多岐にわたる病原微生物をマルチに検索することが可能で、欧州では研究用試薬として臨床に応用され始めている。

これらの中には、多菌種検索のため非特異反応が生じやすいもの、また本来 DNA 汚染の原因となる増幅産物のチューブを開けて操作を行うものもみられる。

いずれの方法を用いても、検索結果を鵜呑みにすることなく、症例の胸部レ線所見、臨床症状と併せて診断することが重要である。

II. MRMP の分離率、耐性メカニズム、薬剤感受性

1. MRMP の分離状況

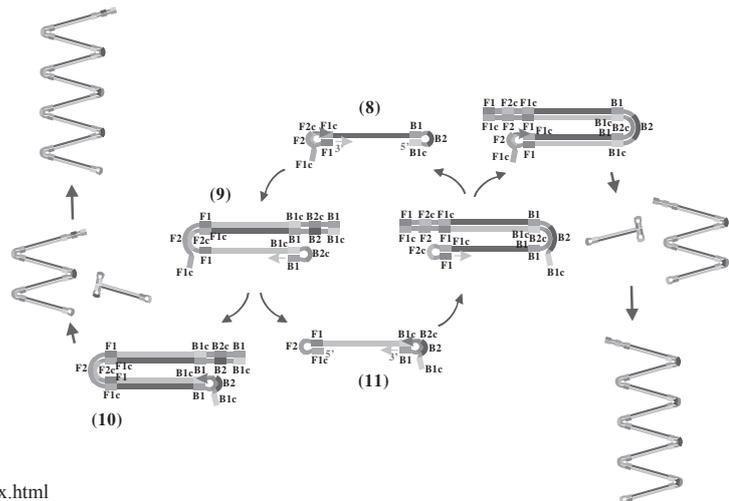
咳嗽を主訴とする肺炎マイコプラズマ感染症は潜伏期間が長く軽症例も多い。このためひとたびある特定集団に本菌が持ち込まれると、ヒトからヒトへと次々に感染し、流行する。つまり、ある特定地域で MRMP が流行すると、当然のことながらその地域での MRMP の分離頻度は高くなる。地域差はあろうが、2011 年以降における日本の MRMP の分離頻度は全国平均で 50% - 90% と推定される。

注目されるのは、MRMP が世界的に分離され始めていることである。隣国の中国、韓国では耐性菌が 90% 以上と報告され^{4,5)}、イスラエル (32%)⁶⁾、イタリア (26%)⁷⁾、フランス (9.8%)⁸⁾、米国 (8%)⁹⁾、カナダ (12.1%)¹⁰⁾、そしてドイツ (3%)¹¹⁾ からも報告されている。

2. MRMP の耐性メカニズム

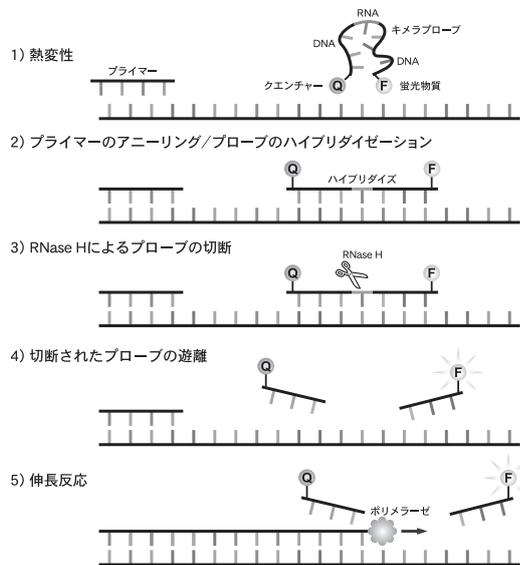
ML 薬の作用標的は細菌におけるタンパク合成を

LAMP法による検索 60分



栄研化学株式会社より <http://www.loopamp.eiken.co.jp/lamp/index.html>

迅速診断キットによる検索 80分



タカラバイオ株式会社 Cycleave®PCR 呼吸器系感染症起因菌検出キット
<http://www.takara-bio.co.jp/>

図 1 PCR による肺炎マイコプラズマの検索法

つかさどるリボソームである。リボソームは図 2 に示すように、16S rRNA と 21 種のタンパクからなる 30S サブユニットと、5S rRNA, 23S rRNA、および 34 種のタンパクからなる 50S サブユニットで構成されている。ML 薬は 50S サブユニットの 23S rRNA に作用する。

ML 薬は、23S rRNA のペプチジルトランスフェラーゼ機能の活性中心に位置するドメイン V (図 3) に結合しタンパク合成を阻害する。したがって、ML 薬がドメイン V に結合する上で重要な塩基に変異が生じると、23S rRNA の立体構造に変化が生じ、ML 薬の結合率が著しく低下し、耐性化する。ML 薬結合の上で最も重要な塩基は、2063 番と 2064 番のアデニン (A) とされる¹³⁾。

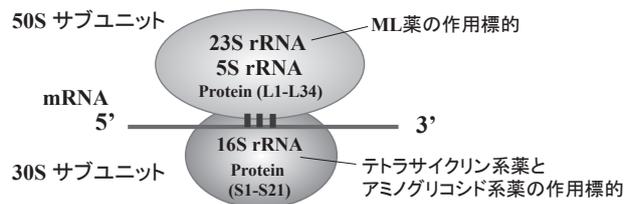
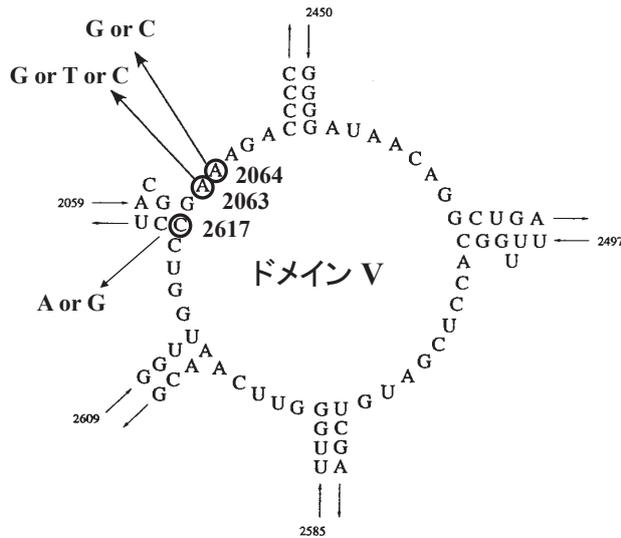


図 2 ML 薬の作用標的としての 23S rRNA

著者らが今までに小児肺炎例の検査材料から分離した MRMP 約 354 株では、ドメイン V の 2063 番の A のグアニン (G) への変異が最も多いが、その他に 2064 番の A と 2617 番のシトシン (C) の変異も報告されている¹⁴⁾。最近では 2063 番と 2617 番の両方の変異を有する株も報告され¹⁵⁾、耐性が多様化しつつあることが示唆される。



Okazaki N, et al. Microbiol. Immunol., 2001 改変

図3 23S rRNAドメインVにおける変異部位

3. MRMP 株の薬剤感受性

MRMPのML薬の感受性成績について、感性菌(MSMP)のそれと比較しながら表1に示す。本来、ML薬はMSMPに対しては極めて優れた抗菌力を示す。しかし、2063番のAの変異株と2064番のAの変異株には、14員環ML薬のエリスロマイシン(EM)とクラリスロマイシン(CAM)、15員環ML薬のアジスロマイシン(AZM)は32 μ g/ml以上のMIC

を示し高度耐性化している。一方、16員環ML薬のジョサマイシン(JM)は変異の位置によって耐性レベルがやや異なるが、いずれにしても耐性であることに違いはない。

一方、肺炎マイコプラズマに対するミノサイクリン(MINO)、ドキシサイクリン(DOXY)、レボフロキサシン、トスフロキサシン(TFLX)の感受性は、MRMPに対してもMSMPに対する感受性と同一レベルの0.5-1 μ g/mlのMICを示す。この他に、ガレノキサシンやシタフロキサシンは0.031 μ g/mlの優れた感受性を示す¹⁴⁾。

III. MRMPによる発症例の特徴と治療

1. MRMPによる発症例の特徴

マイコプラズマ肺炎の発症は本菌が気道の線毛上皮細胞に付着・増殖し、細胞障害が直接的な誘因となって次第に各種炎症性サイトカインが産生され始め、炎症反応が増強される(間接障害)。肺炎マイコプラズマは細胞壁を持たないこともあり、過酸化水素や、community-acquired respiratory distress syndrome toxin (CARDS TX)などの細胞傷害性因子を産生するものの、菌そのものが宿主のヒトに対して直接強い障害を与えるものではないことが明ら

表1 肺炎マイコプラズマのML薬、およびその他抗菌薬感受性 (n=792)

抗菌薬 感性、耐性(変異ヶ所)	MIC (μ g/mL)		
	50%	90%	Range
エリスロマイシン			
MSMP ^{a)}	0.0078	0.0156	0.00195-0.0313
MRMP ^{b)} 2063番の変異	64	>64	32- >64
MRMP ^{b)} 2064番の変異	>64	>64	64- >64
クラリスロマイシン			
MSMP ^{a)}	0.0039	0.0078	0.00049-0.0313
MRMP ^{b)} 2063番の変異	64	>64	32- >64
MRMP ^{b)} 2064番の変異	64	64	16- >64
アジスロマイシン			
MSMP ^{a)}	0.00049	0.00098	0.00012-0.00195
MRMP ^{b)} 2063番の変異	32	64	4- >64
MRMP ^{b)} 2064番の変異	32	64	16-64
ジョサマイシン			
MSMP ^{a)}	0.0313	0.0625	0.0156-0.0625
MRMP ^{b)} 2063番の変異	8	16	0.0625-64
MRMP ^{b)} 2064番の変異	64	>64	64- >64
ミノサイクリン ^{c)}	0.5	1	0.0313-2
ドキシサイクリン ^{c)}	0.5	0.5	0.0625-0.5
レボフロキサシン ^{c)}	0.5	1	0.125-1
トスフロキサシン ^{c)}	0.5	0.5	0.25-0.5

a)マクロライド感性
b)マクロライド耐性
c)すべての菌株の成績

かにされている。

岡田ら²⁾、鈴木ら¹⁶⁾は小児のマイコプラズマ肺炎について、MRMPとMSMPのいずれかによる発症例の臨床所見を比較すると、MRMPによる肺炎例では有熱期間が有意に長く、咳嗽等の臨床症状も遷延化していたと報告している。また、MRMPによる肺炎例では、MSMP例に較べて治療抗菌薬がML薬からMINO等への変更例が多かったとしている²⁾。

ちなみに、著者らのグループはMINO、DOXY、TFLX投与後の菌量を、real-time PCRを用いて算出しているが、前2薬剤の投与群では他薬に較べ投与後24時間以内の解熱と菌量の明らかな低下とを有意差をもって認めている²⁾。肺炎マイコプラズマは遅発育菌であるため、血中半減時間が短い薬物は分裂時間内に薬物が菌体内へ十分取り込まれないことが一因と思われる。

2. マイコプラズマ肺炎に対する治療指針

表1に示すように、ML薬はMSMPに対して優れた感受性を示すため、マイコプラズマ肺炎の第一選択薬にはML薬が推奨される。MSMPによる肺炎であれば48時間以内に解熱するはずである。ML薬投与後2-3日で解熱がみられなければ、耐性率の現状からもMRMPの可能性が極めて高くなる。したがって、ML薬が無効のマイコプラズマ肺炎例に対しては、TFLXあるいはテトラサイクリン系薬が二次選択薬として適応となる。ただし、テトラサイクリン系薬は歯牙着色、エナメル質形成不全などの副反応を有するため、8歳未満の小児に対しては原則禁忌となっている。またTFLXに関しては、肺炎は適応症として認められているが、肺炎マイコプラズマは現時点で適応菌種に含まれていない。「小児呼吸器感染症診療ガイドライン2011」¹⁷⁾では、それらの問題点を踏まえた上で抗菌薬の選択や投与期間について記述されている。耐性菌出現や副反応発現の防止の面からも、ガイドラインで推奨されている抗菌薬の選択、薬剤ごとの投与期間を遵守することが重要である。

前述したように、肺炎マイコプラズマ感染症の病態は宿主の免疫反応に大きく依存している。宿主の過剰な免疫反応により、まれに重篤な臨床像を呈する場合がみられる。血清LDHやフェリチンが異常

高値を示すような重症肺炎症例では、適切な抗菌薬の使用だけでなく、高サイトカイン血症の併発を考慮した副腎皮質ステロイドの投与が必要となる可能性が高い。ただ、副腎皮質ステロイドの使用条件については、今後さらに明確にする必要がある。

おわりに

肺炎マイコプラズマ感染症は自然治癒傾向のみられる疾患であり、耐性菌による肺炎であっても必ずしも重症化あるいは難治化するわけではない。しかし、MRMPによる小児肺炎例に対して、かつて第一選択薬であったML薬を使用しても臨床症状は改善せず遷延化する例が多いことや、中には重症化する例も認められることは事実である。

最も留意すべき点は、肺炎マイコプラズマ感染症はひとたび家族内あるいは学校内等に持ち込まれると、次々と感染が拡大することである。MRMPを含む肺炎マイコプラズマの拡散を抑えるためには、適切な抗菌薬を投与し、発症例の菌量を速やかに減らして菌を拡散させないようにすることが重要である。

文 献

- 1) 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* 2001; **45**: 617-620.
- 2) Okada T, Morozumi M, Tajima T, et al. Rapid Effectiveness of minocycline or doxycycline against macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection in a 2011 outbreak among Japanese children. *Clin Infect Dis*. 2012; **55**: 1642-1649.
- 3) Isozumi R, Yoshimine H, Morozumi M, et al. Adult case of community-acquired pneumonia caused by macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*. *Respirology* 2009; **14**: 1206-1208.
- 4) Liu Y, Ye X, Zhang H, et al. Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma pneumoniae* isolates and molecular analysis of macrolide-resistant strains from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 2160-2162.
- 5) Hong KB, Choi EH, Lee HJ, et al. Macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae*, South Korea, 2000-2011. *Emerg Infect Dis*. 2013; **19**: 1281-1284.
- 6) Averbuch D, Hidalgo-Grass C, Moses AE, et al. Macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae*, Israel, 2010. *Emerg Infect Dis*. 2011; **17**: 1079-1082.

- 7) Chironna M, Sallustio A, Esposito S, et al. Emergence of macrolide-resistant strains during an outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* infections in children. J Antimicrob Chemother, 2011 ; **66** : 734-737.
- 8) Peuchant O, Ménard A, Renaudin H, et al. Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in France directly detected in clinical specimens by real-time PCR and melting curve analysis. J Antimicrob Chemother 2009 ; **64** : 52-58.
- 9) Yamada M, Buller R, Bledsoe S, et al. Rising Rates of Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in the central United States. Pediatr Infect Dis J 2012 ; **31** : 409-411.
- 10) Eshaghi A, Memari N, Tang P, et al. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in humans, Ontario, Canada, 2010-2011. Emerg Infect Dis. 2013 ; **19**. doi : 10.3201/eid1909.121466.
- 11) Dumke R, von Baum H, Lück PC, et al. Occurrence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains in Germany. Clin Microbiol Infect 2010 ; **16** : 613-616.
- 12) Saito R, Misawa Y, Moriya K, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae*. J Med Microbiol. 2005 ; **54** : 1037-1041.
- 13) Lucier TS, Heitzman K, Liu SK, et al. Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1995 ; **39** : 2770-2773.
- 14) Morozumi M, Takahashi T, Ubukata K: Macrolides-resistant *Mycoplasma pneumoniae* : characteristics of isolates and clinical aspects of community-acquired pneumonia. J Infect Chemother 2010 ; **16** : 78-86.
- 15) Wang Y, Qiu S, Yang G, et al. An Outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* caused by a macrolide-resistant isolate in a nursery school in China. Antimicrob Agents Chemother 2012 ; **56** : 3748-3752.
- 16) Suzuki S, Yamazaki T, Narita M, et al. Clinical evaluation of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2006 ; **50** : 709-712.
- 17) 小児呼吸器感染症診療ガイドライン作成委員会；日本小児呼吸器疾患学会・日本小児感染症学会「小児呼吸器感染症診療ガイドライン2011」