

迅速マクロライド耐性マイコプラズマ遺伝子診断 が外来治療に及ぼすインパクト

田中 裕士^{1,2)}

¹⁾ 札幌せき・ぜんそく・アレルギーセンター*

²⁾ 医大前南 4 条内科

受付日：2019 年 12 月 20 日 受理日：2020 年 2 月 28 日

マイコプラズマ呼吸器感染症の早期診断は、血清診断から咽頭拭い液を用いた遺伝子診断へとシフトしつつある。最近 polymerase chain reaction 法で核酸を増幅し、蛍光標識プローブ (QProbe[®]) を用いた検査機器が本邦で 2 社から発売され (GENECUBE[®]マイコプラズマ・ニューモニエ, およびスマートジーン[®]Myco), マクロライド耐性 *Mycoplasma pneumoniae* を 30~50 分以内に判明できるようになった。すなわちプライマリ・ケアでの外来現場で、本菌でのマクロライド耐性の有無を判定することによって、抗菌薬の適正使用を促進するものと期待される。

Key words: macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*, rapid detection, quenching probe, point of care molecular diagnostic

I. 薬剤耐性菌における最近の傾向

本邦における最近の *Mycoplasma pneumoniae* 肺炎の発症状況は、2つの大きな流行 (2011~2012 年, 2015~2016 年) があり、毎年局地的に小流行が繰り返されている。マクロライド耐性 *M. pneumoniae* は、23S rRNA の peptidyl-transferase ドメイン V における単一点突然変異であり 2,063 番目のアデニン (A) がグアニン (G) に置換された株 (A2063G) が最も多く、次に A2064G であり、その他チミン (T) やシトシン (C) への変異株 A2063T, A2063C や C2617A, C2617G があるがわずかである。Oishi¹⁾ は、異なる流行時期に全国 85 施設の 15 歳以下の小児から分離された菌株を用いて、薬剤感受性を比較し、2012 年のマクロライド耐性菌は 81.8% であったものが、2018 年には 14.3% と低下していたと報告している。2019 年の日本マイコプラズマ学会発表データではさらに 10% 程度にまで低下してきた。2つの流行時期では、2011~2012 年と比較して

2015~2016 年では 1) トスフロキサシンとレボフロキサシンの最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC) には変化なく、2) ミノサイクリン、クラリスロマイシン、アジスロマイシンでは MIC が有意に改善していた¹⁾。その理由として、*M. pneumoniae* の接着蛋白の一つである P1 蛋白の遺伝子における塩基配列の違いで分けられる I 型と II 型のサブタイプのうち、2011~2012 年では I 型がほとんどで、2015~2016 年では II 型のサブタイプが急激に増加したためと考えられている²⁾。このタイプシフトは約 10 年ごとに起こっており、I 型に比べて II 型はマクロライド耐性菌の頻度が低く³⁾、P1 遺伝子のタイプシフトによって最近の耐性率変化が起こったものと考えられる。また、*M. pneumoniae* 呼吸器感染症は秋から冬にかけて増加しそれに伴って臨床分離株も増加する。2016 年 5 月~2017 年 4 月までの 3 次医療機関における小児~若年成人での検討では、8~12 月の期間に分離数が増え、マ

*北海道札幌市中央区南 4 条西 15 丁目 1-32

クロライド耐性菌の分離率は2016年から徐々に低下していた⁴⁾。一方、キノロン耐性 *M. pneumoniae* は試験管内でセレクションされたMICが4 µg/mL以上の菌株が報告され、対象となった薬剤ではレボフロキサシンでのMIC上昇の頻度が高く、スバルフロキサシンやガチフロキサシンでは頻度が低いと報告されている⁵⁾。2019年の日本マイコプラズマ学会第46回学術集会(札幌市)でのシンポジウムでは、本邦のキノロン耐性 *M. pneumoniae* 臨床株は報告されていない。中国でもキノロン系薬、テトラサイクリン系薬に対して薬剤感受性試験で耐性を示す *M. pneumoniae* は検出されていないが、1菌体中に複数のキノロン耐性遺伝子変異を有する *M. pneumoniae* が、臨床検体から分離されていると報告されており⁶⁾、今後の動向に注意が必要である。

II. *M. pneumoniae* 感染症の診断

本菌による呼吸器感染症の約85%は上気道炎、気管支炎、残り約15%が肺炎を呈するとされている。本邦における『成人肺炎診療ガイドライン2017』でのA-DROPの重症判定では、多くの *M. pneumoniae* 肺炎は5つの項目すべて当てはまらず、そのほとんどが軽症肺炎として分類され、プライマリ・ケア、外来での治療が推奨されている。プライマリ・ケアでの診断は、これまでの血清反応から鼻汁咽頭液、咽頭スワブまたは喀痰からの菌の直接証明による迅速検査(point of care testing; POCTやpoint of care molecular diagnostic; POCMD)が主流になりつつあり、診察室、病棟および外来など、患者に近い医療現場でその結果を即座に治療へ応用する。本邦におけるこれまでの血清診断の多くは微粒子凝集法(PA法)や補体結合反応(CF法)が用いられ、ペア血清で4倍以上の上昇が必要であった。ペア血清の採血間隔における最近の検討では、発熱または咳嗽を第1病日とした場合、第6病日以前と第9病日以降の血清で検討すると有意な上昇を最短で確認することができると発表されている(森 俊彦, 他:マイコプラズマ感染症小児のPA抗体価についての検討。日本マイコプラズマ会誌 2019; 46: 79-81)。また培養検査には約1週間必要であり、プライマリ・ケアの現場では使えなかった。次に、感染局所検体からの菌の遺伝子検出法として、咽頭拭い液を用い約3時間で判定可能なloop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を用いた遺伝子

診断と、約15分で判定可能なイムノクロマト法を用いた簡易菌体蛋白検出法のキットが現在7種類使用可能である。これらの測定キットにおける検出蛋白はそれぞれ異なり、リボゾーム蛋白であるL1/L12、ヒートショック蛋白であるDnak、接着器官構成蛋白P1やP30など検査キットによって認識部位が異なる。特異度はともに90%以上と良好だが感度が60~70%と低い。LAMP法の検出感度は $10^0 \sim 10^2$ 菌体/反応で、4本の基本プライマーを用いていることやヘモグロビンなどの増幅反応阻害物質の影響を受けにくいことから特異度が高く、さらに等温での増幅が可能であるという特徴があるため、イムノクロマト法の性能の対照となっており小児領域の学会でも推奨されている。ただし、測定専用機器が他の方法と比較して高価である。イムノクロマト法はLAMP法よりも検出感度が10~100倍位低く、 $10^3 \sim 10^4$ CFU/mLである。小児では陽性率は高いが、成人では陽性率が低く、検体採集前に十分咳嗽をさせた後に咽頭後壁の口蓋下垂の裏をひっかくように綿棒をこするとよい。イムノクロマト法ではひと工夫が加えられ、感度が上昇した本邦独自の検査測定機器がクイックチェイサー Immuno Reader(ミズホメディー)や富士ドライケム IMMUNO AG1(富士フイルム)である。標識に用いる金コロイド粒子を写真現像の銀増幅原理を応用して100倍感度を増幅し、洗浄を加えて特異度も向上させた。増幅前の金コロイドの粒子径は0.05 µmで、増幅後の銀粒子径が6 µmでありそれにより感度が上昇している。本キットとreal time polymerase chain reaction (PCR)両者の結果はほぼ一致するが100%ではなく、偽陽性、偽陰性がわずかには存在することを念頭に置くべきである。

III. 薬剤耐性菌感染における診断の進歩

マクロライド耐性 *M. pneumoniae* 感染症の早期診断に、咽頭拭い液を用いた、全自動遺伝子解析装置が発売され臨床応用が始まっている。この装置の共通部分はPCR法で核酸増幅し、Quenching (Q) Probe[®]法で核酸検出する(QProbe[®]法は日鉄環境が特許権を有している)。QProbe[®]はプローブ末端のシトシンに蛍光物質が結合しており、ターゲット遺伝子に結合できていない場合には蛍光を発する特徴がある。この性質を利用して、菌に変異がない場合にはターゲット遺伝子と結合できるため蛍光は消失

するが、菌に変異がある場合ターゲット遺伝子と結合できていないので蛍光を発し続ける。この機序を利用して、それぞれの機器においてどの温度で結合するかを設定して測定するものである。

その解析装置の一つである [GENECUBE[®]マイコプラズマ・ニューモニエ] (東洋紡) が病院の検査室で使用されている⁷⁾。検査時間は検体前処理1分、測定時間30分である。23s rRNA 遺伝子領域をターゲットとして、QProbe[®]法を用いて *M. pneumoniae* の1塩基での変異を同時に8検体まで検出して耐性菌か否かを検出する。60℃付近で23s野生型(感受性株)に、50℃付近で変異菌(耐性株)に蛍光強度のピークが出ることを利用して検出する。筑波メディカルセンター病院で [GENECUBE[®]マイコプラズマ・ニューモニエ] を使用して陽性と判断された173例中91例が変異株であり、シーケンス解析の結果(A2063Gが90例、A2064Gが1例)と一致していた⁸⁾。小児 *M. pneumoniae* 肺炎375名を対象とした医師による適正な抗菌薬処方への行動変化を検討した報告⁹⁾では、ほとんどの症例で [GENECUBE[®]マイコプラズマ・ニューモニエ] の結果が診察時に判明したため、陽性例223名では適切な抗菌薬の処方割合が増加し、陰性例152名では不適切な抗菌薬の処方率が低下し、この迅速検査が医師の抗菌薬処方に影響があることが示された。最近、液体輸送培地 eSwab 480CE (コパン・ジャパン社)、オプティスワブ トランスポート・システム LA-106 (スギヤマゲン社) を用いると1本の検体から培養と遺伝子検査ができるようになった。

これらの測定機器とほぼ同じ機能を持ち、より安価な迅速検出機器 [スマートジーン[®]Myco] (ミズホメディ) が2018年10月より主に開業医で、POCT、POCMDとして稼働している。QProbe[®]は95℃で蛍光が光り、66℃で *M. pneumoniae* ターゲットジーンに結合すると消えるが、変異があると66℃では結合できず55℃で結合してようやく消える。逆にPCR終了時点で *M. pneumoniae* 陰性ならば55℃でも蛍光し続ける。本機器は30~50分で判定でき、1回1検体ずつ測定する。医大前南4条内科(札幌市、以下当院)では、他施設共同研究として、本機器による結果と、real time PCR との比較を行っており、中間報告として2019年の日本マイコプラズマ学会46回学術集会(札幌市)で発表し

たが、100%の一致率であり、他の施設での発表でも血清診断とも一致した。

IV. 外来診療における変化

POCMDとして登場したこの2つの、マクロライド耐性 *M. pneumoniae* 迅速遺伝子キットの登場で、外来診療現場がどのように変化したか。マクロライド耐性菌か否かが、初診での抗菌薬を選定するうえで参考となっている。両測定器の限界点として、A2063G、A2064G以外の耐性菌については検出できないが、本邦での全国調査では、これら2種の菌でマクロライド耐性菌の96%以上を占めると報告されている¹⁰⁾。小児肺炎患者98名でのGENECUBE[®]を用いた *M. pneumoniae* およびマクロライド耐性菌迅速検出の有用性を有熱期間で検討した報告では、GENECUBE[®]迅速検査群の32名で発熱期間は6.0日であったのに対して、後日検査群(経験的治療)の66名では7.5日と有意な差が認められた⁷⁾。しかし retrospective な検討のためマクロライド耐性率は、迅速検査群では25%、後日検査群では67%と差があり⁷⁾、今回の検討のみでの解釈には限界があると思われる。

2011年11月から2019年11月の期間に、当院での外来診療で、本呼吸器感染症と臨床的に疑った全例(702名)を retrospective に検討したので紹介したい。保険適用上の制約があり診断方法は以下の3ついずれかを使用した。1) 血中PA抗体の有意な上昇(ペア血清で4倍以上の上昇または単血清で320倍以上)、2) 咽頭拭い液を用いたイムノクロマト法による検査(リボテスト[®]マイコプラズマ、クイックナビ[™]マイコプラズマ、クイックチェイサー[®] Auto Myco のいずれか)、3) 咽頭拭い液を用いた迅速遺伝子(PCR法)検査による検査(スマートジーン[®]Myco)。2011年11月から2013年10月までに臨床的に *M. pneumoniae* 感染症を疑った438名(平均41±15歳)中、血中PA抗体の有意な上昇によって確定診断できたのは72名(16.4%)。2013年11月から2018年9月の期間中、臨床的に *M. pneumoniae* 感染症を疑った214名(平均32±14歳)中47名(21.9%)がイムノクロマト法によって診断され、2018年10月から2019年11月では、臨床的に *M. pneumoniae* 感染症を疑った50名(平均32±8歳)中、PCR法を用いた迅速遺伝子キット(スマートジーン[®]Myco)によって *M. pneumoniae* 感

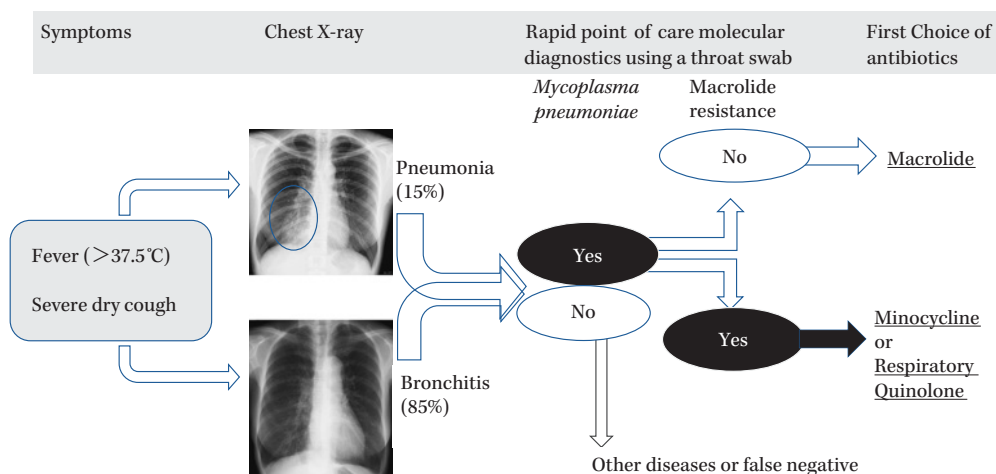


Fig. 1. A novel strategy; Rapid detection of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* by point of care molecular diagnostics using a throat swab may change the diagnosis and treatment of *M. pneumoniae* respiratory infection in outpatient clinics.

染症と診断されたのは17名(34%)であった。また、診断された17名から分離された *M. pneumoniae* のすべてがPCR法による遺伝子変異がないマクロライド感性と判定された。診断法の進歩により *M. pneumoniae* 感染症と診断が確定できた症例がわずかながら増加する傾向がみられた。

外来での診断法の進歩によって、外来初診日に第一選択薬のマクロライド系薬と、第二選択薬(8歳~成人:テトラサイクリン系薬,ニューキノロン系薬,8歳未満の小児:トスフロキサシン)のどちらで先に治療するのがベストであるかを判断できる時代となってきた(Fig. 1)。治療効果を判定するには72時間後が1つの基準になるが、*M. pneumoniae* の抗菌薬耐性がはっきりすると、現在の感染が、マクロライド感性的 *M. pneumoniae* 単独なのか、マクロライド耐性的 *M. pneumoniae* なのか、肺炎球菌など他の細菌との合併感染なのかについても推測が立てやすく、治療のレベルの上昇にも寄与できると考える。

おわりに

M. pneumoniae のマクロライド耐性まで外来かつ短時間で判明するキットの出現により、本感染症の速やかな診断と抗菌薬の適正使用に貢献するものと思われる。

利益相反自己申告: 田中裕士は杏林製薬株式会社,

アストラゼネカ株式会社, グラクソスミスクライン株式会社より講演料を受けている。

文献

- Oishi T, Takahashi K, Wakabayashi S, Nakamura Y, Ono S, Kono M, et al: Comparing antimicrobial susceptibilities among *Mycoplasma pneumoniae* isolates from pediatric patients in Japan between two recent epidemic periods. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; 63: e02517-18
- Katsukawa C, Kenri T, Shibayama K, Takahashi K: Genetic characterization of *Mycoplasma pneumoniae* isolated in Osaka between 2011 and 2017: decreased detection rate of macrolide-resistance and increase of *p1* gene type 2 lineage strains. *PLoS One* 2019; 14: e0209938
- Kenri T, Okazaki N, Yamazaki T, Narita M, Izumikawa K, Matsuoka M, 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* 2008; 57: 469-75
- Akashi Y, Hayashi D, Suzuki H, Shiigai M, Kanemoto K, Notake S, et al: Clinical features and seasonal variations in the prevalence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*. *J Gen Fam Med* 2018; 19: 191-7
- 大屋日登美, 古川一郎, 相川勝弘, 大石智洋, 堀野敦子, 見理 剛, 他: 試験管内でセレクションされたニューキノロン耐性 *Mycoplasma pneumoniae*。日マイコプラズマ会誌 2017; 44: 45-8
- Guo D X, Hu W J, Wei R, Wang H, Xu B P, Zhou W, et al: Epidemiology and mechanism of drug resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in

- Beijing, China: A multicenter study. *Bosn J Basic Med Sci* 2019; 19: 288-96
- 7) Ito Y, Iwashima S, Hayano S, Nishio T, Shiozawa R, Yata S, et al: Rapid detection of the macrolide sensitivity of pneumonia-causing *Mycoplasma pneumoniae* using quenching probe polymerase chain reaction (GENECUBE®). *Mol Diagn Ther* 2018; 22: 737-47
- 8) 川嶋洋介, 上倉佳子, 山下計太, 野竹重幸, 中村浩司, 木全伸介, 他: 全自動遺伝子解析装置 GENECUBE を利用した *Mycoplasma pneumoniae* のマクロライド耐性遺伝子変異検出法の構築および評価。日臨微生物誌 2018; 28: 98-105
- 9) Hayashi D, Akashi Y, Suzuki H, Shiigai M, Kanemoto K, Notake S, et al: Implementation of point-of-care molecular diagnostics for *Mycoplasma pneumoniae* ensures the correct antimicrobial prescription of pediatric pneumonia patients. *Tohoku J Exp Med* 2018; 246: 225-31
- 10) Tanaka T, Oishi T, Miyata I, Wakabayashi S, Kono M, Ono S, et al: Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection, Japan, 2008-2015. *Emerg Infect Dis* 2017; 23: 1703-6

Impact of rapid point-of-care molecular diagnostics for macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* at outpatient clinics

Hiroshi Tanaka^{1,2)}

¹⁾ Sapporo Cough, Asthma, and Allergy Center, 1-32 South-4, West-15, Chuo-ku, Sapporo, Hokkaido, Japan

²⁾ Idaimaeminamiyojo Internal Medicine Clinic

Early diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory infection in outpatient clinics might be accomplished by changing the diagnostic test from serum antibody examination to rapid point-of-care molecular diagnostics using a throat swab. In Japan, a novel detection technique based on a quenching probe polymerase chain reaction has been developed. Two commercial devices for detecting macrolide-resistant *M. pneumoniae* are available; GENECUBE® *M. pneumoniae* and SmartGene® Myco. They can be used for automated gene analysis, including nucleic acid extraction, amplification, and detection of the macrolide-resistant strains A2063G and A2064G, within 30 to 50 minutes. These tests might be useful to ensure correct antimicrobial prescription by primary care doctors.