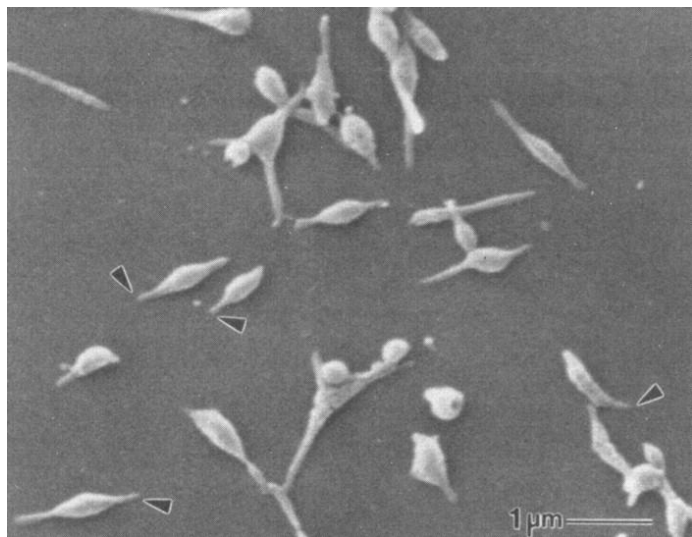


インフルエンザ学術講演会

「マクロライド耐性マイコプラズマは何故生まれたか？」
を考える



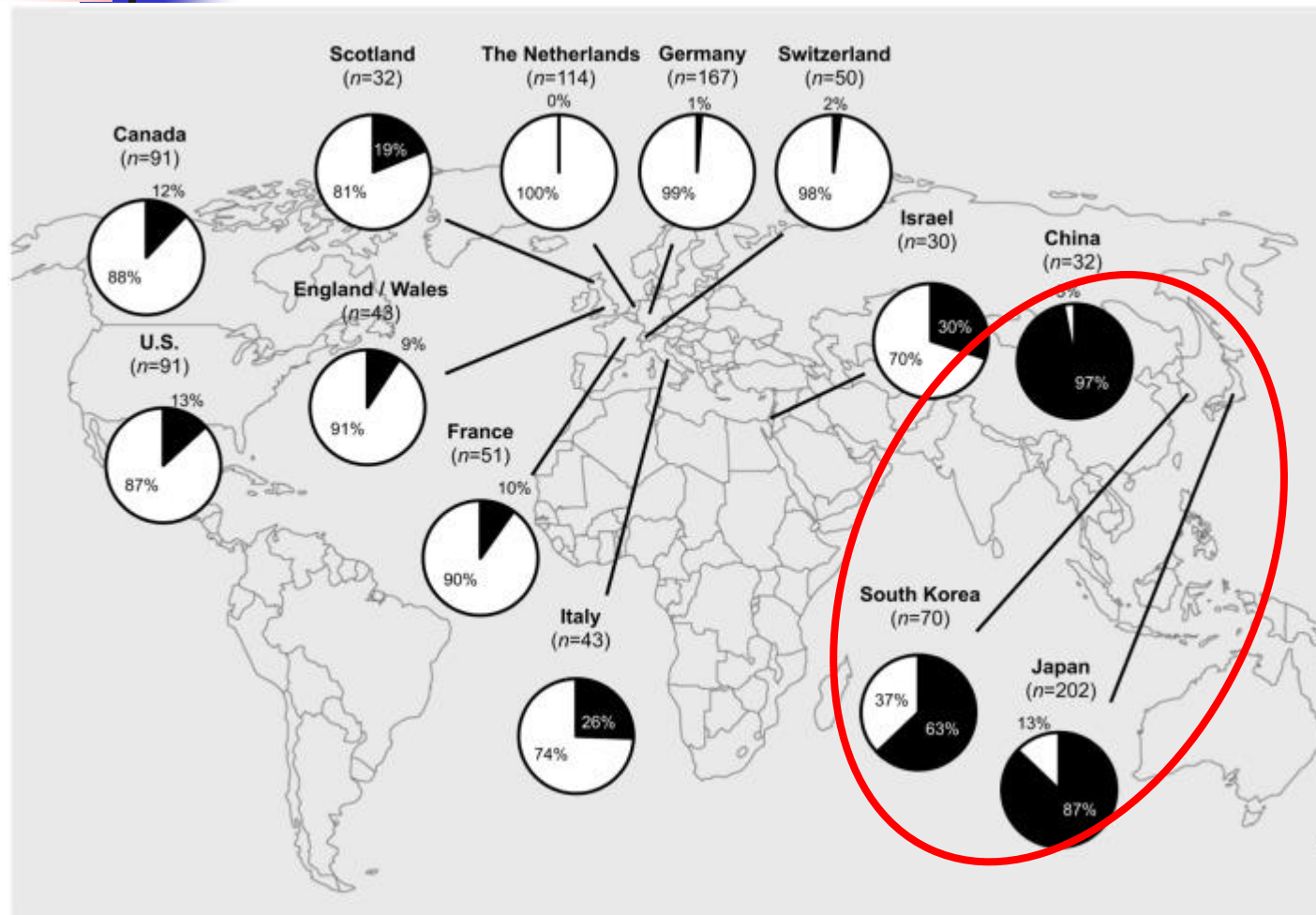
Clin Micro 2004; 17: 697-728

東栄病院 小児科 菊田英明

2017年12月8日

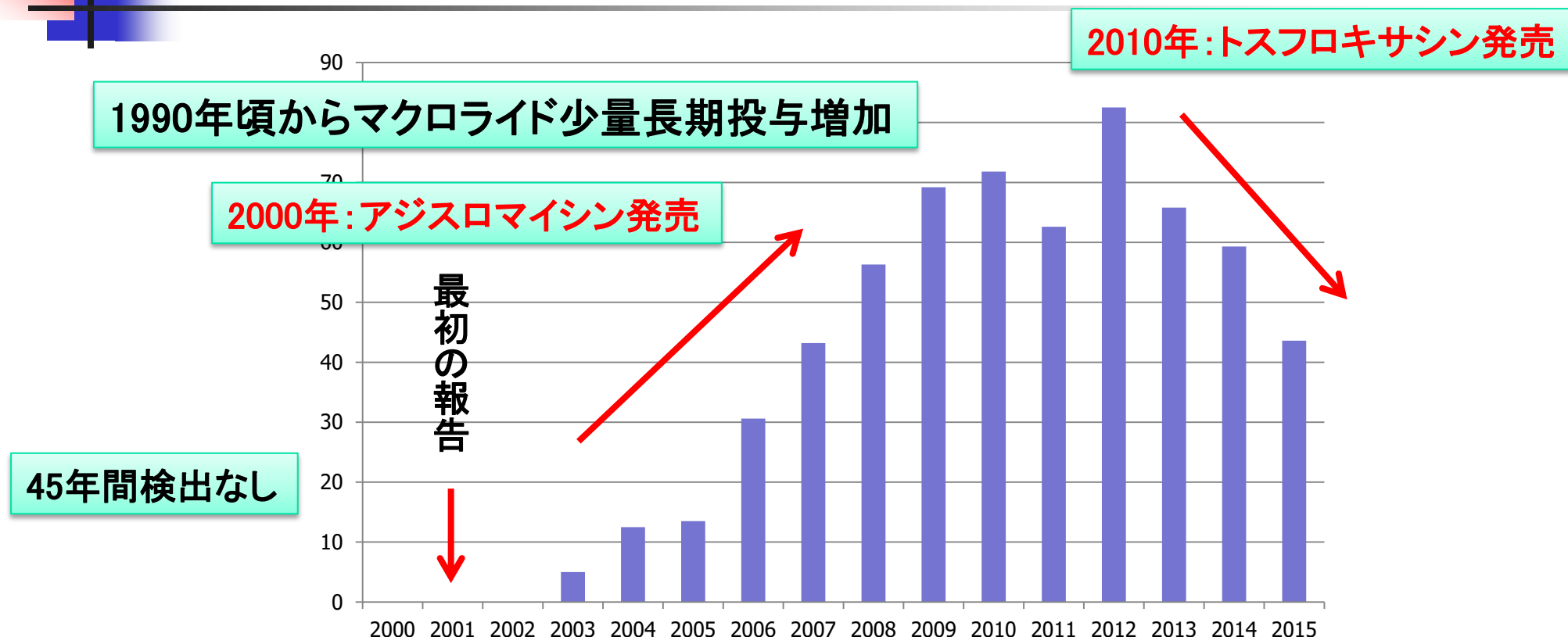
共催: 塩野義製薬株式会社
中外製薬株式会社

世界のマクロライド耐性マイコプラズマ (Macrolide-resistant *M. pneumoniae* : MRMP) の頻度



MRMPはアジアで多い

日本の マクロライド耐性マイコプラズマ(MRMP)年次頻度



1955年: エリスロマイシン発売
1991年: クラリスロマイシン発売

Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 348–350
Antimicrob Agents Chemother 2013; 57: 4046–4049
Emerg Infect Dis 2017; 23: 1703–1706

リボソームと抗菌薬

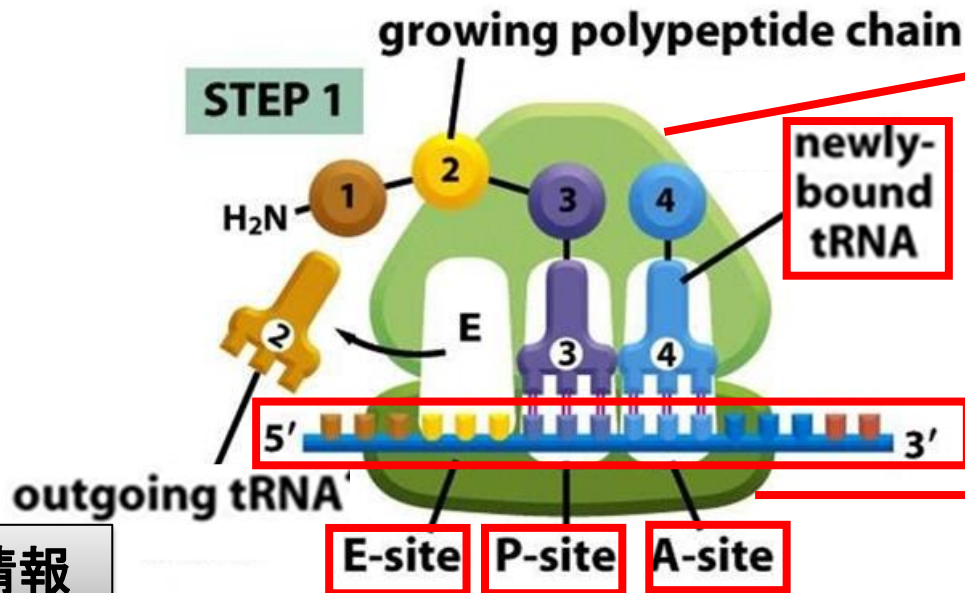


Ribosome of prokaryotes (原核生物)

rRNA: 蛋白合成の場 (ribozyme: RNA酵素)

tRNA: 運搬

mRNA: 遺伝情報



Large 50S ribosomal subunit
: 5S and 23S ribosomal RNAs
and 34 proteins.
ペプチド結合転移中心
(Peptidyl Transferase Center: PTC)

Small 30S ribosomal subunit
: 16S ribosomal RNA and 21
proteins
mRNAの配列の読み取り場所。

A-site is occupied by aminoacyl-tRNA

P-site is peptidyl-tRNA

E-site is harbouring decylated tRNA

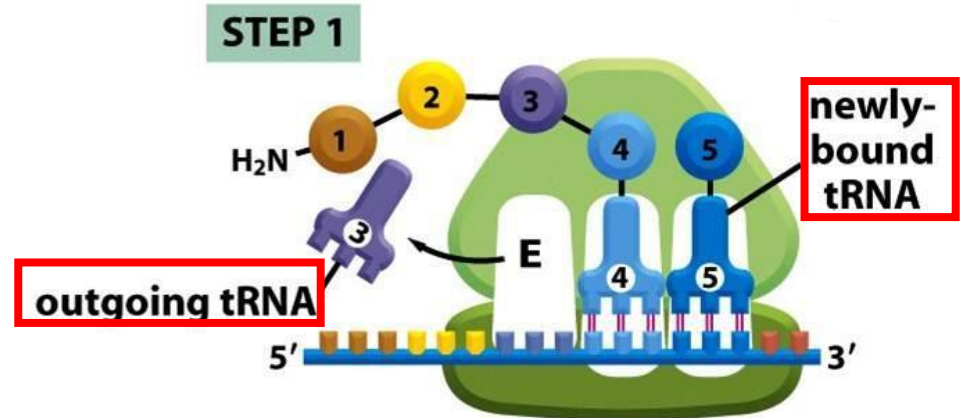
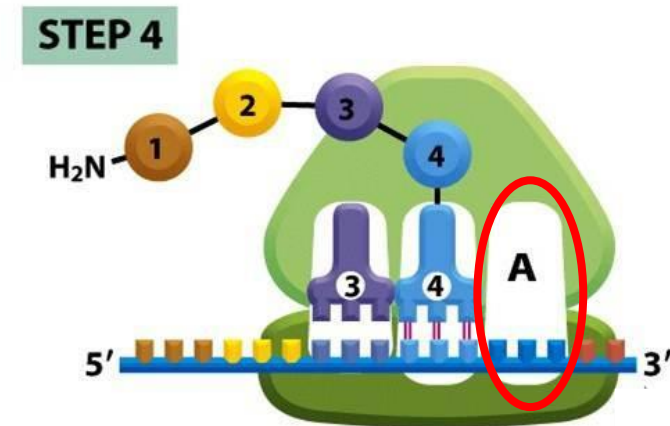
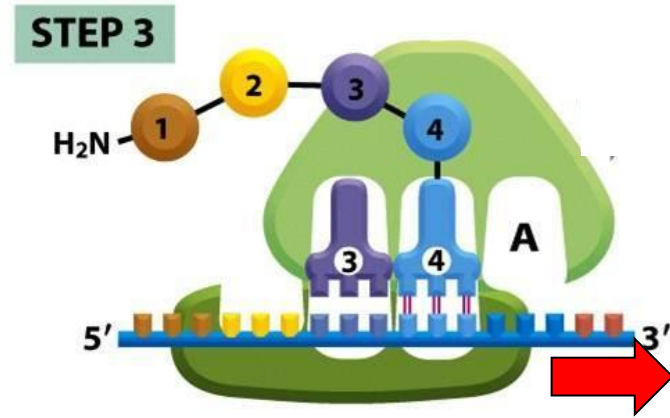
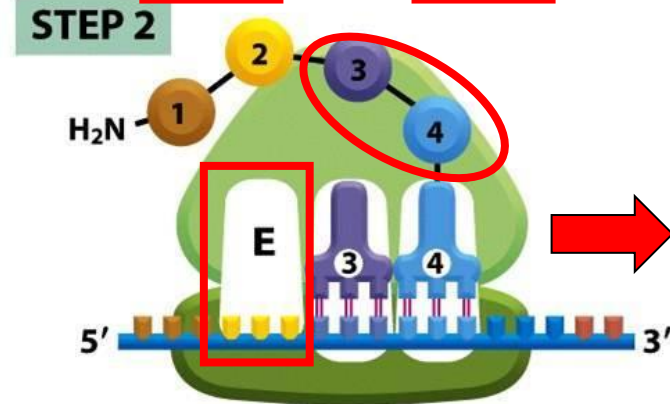
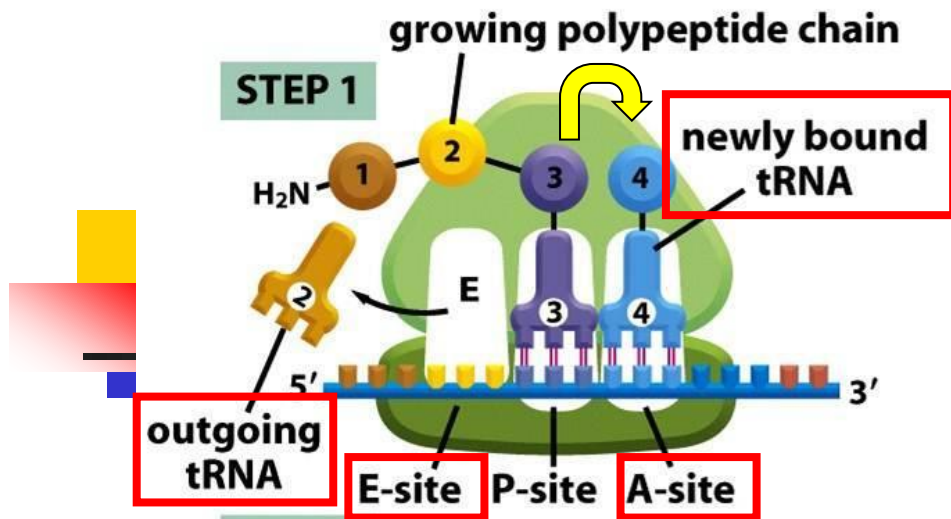
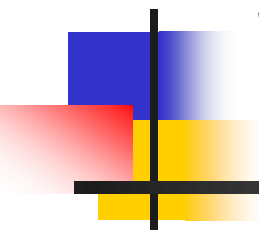


Figure 6-66 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

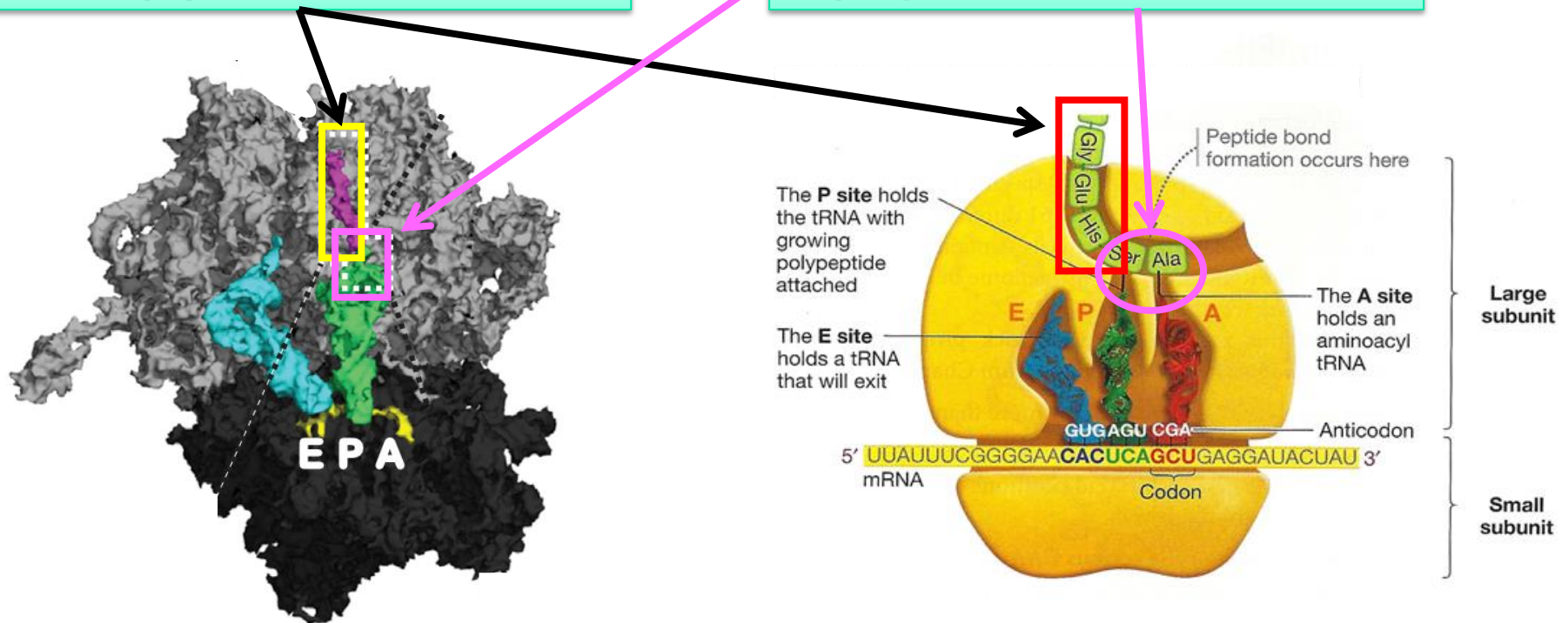


マクロライドの作用機序

Nascent peptide exit tunnel (NPET) and Peptidyl Transferase Center (PTC)

Nascent peptide exit tunnel (NPET)

Peptidyl Transferase Center (PTC)



マクロライド系薬の作用機序

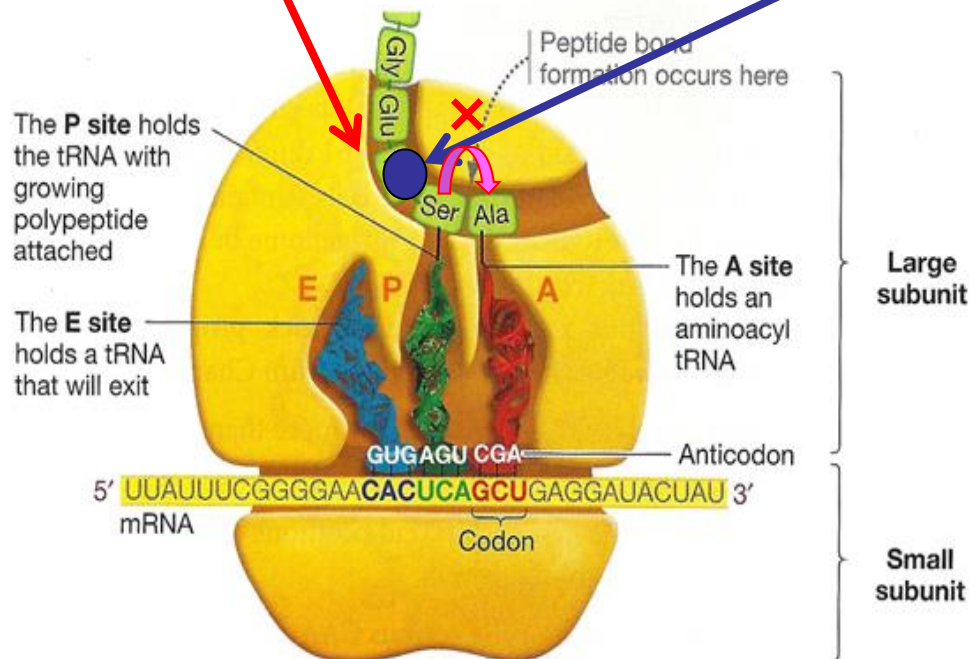
Nascent peptide exit tunnel (NPET)

狭窄部位

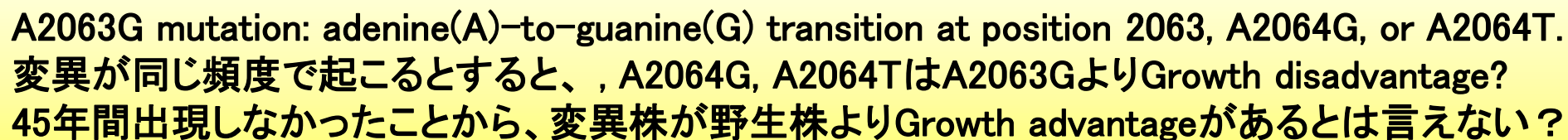
内壁は主としてrRNAで構成されているが、リボソームタンパク質L22とL4により一部狭くなっている部位がある。

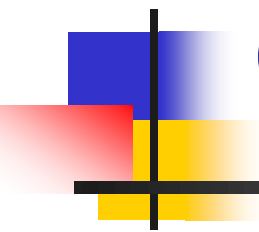
マクロライド系薬はこの狭窄部位にひっかかりPからAへのnascent peptideの **transpeptidation (ペプチド転移)** を抑制し、**タンパク合成を阻害**する。

リボゾームの23s rRNAの変異により、マクロライド系薬が結合できなくなり、**タンパク合成が進み、耐性**となる。



MRMPは23S リボソームRNAのDomain Vの点変異により起きる。

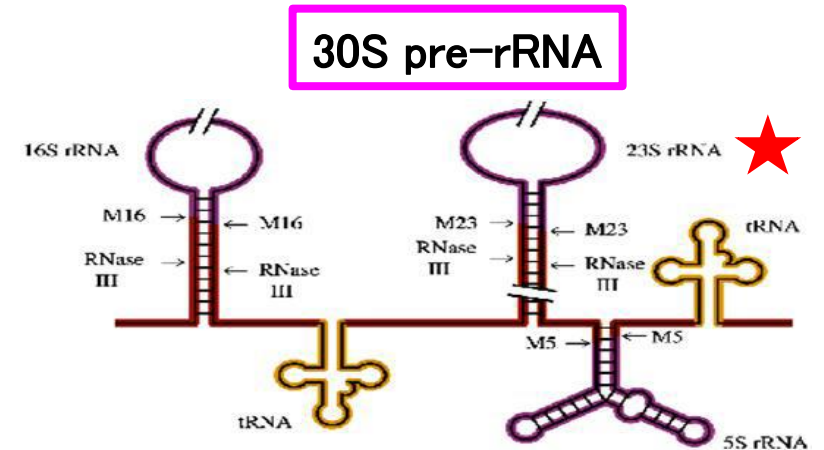
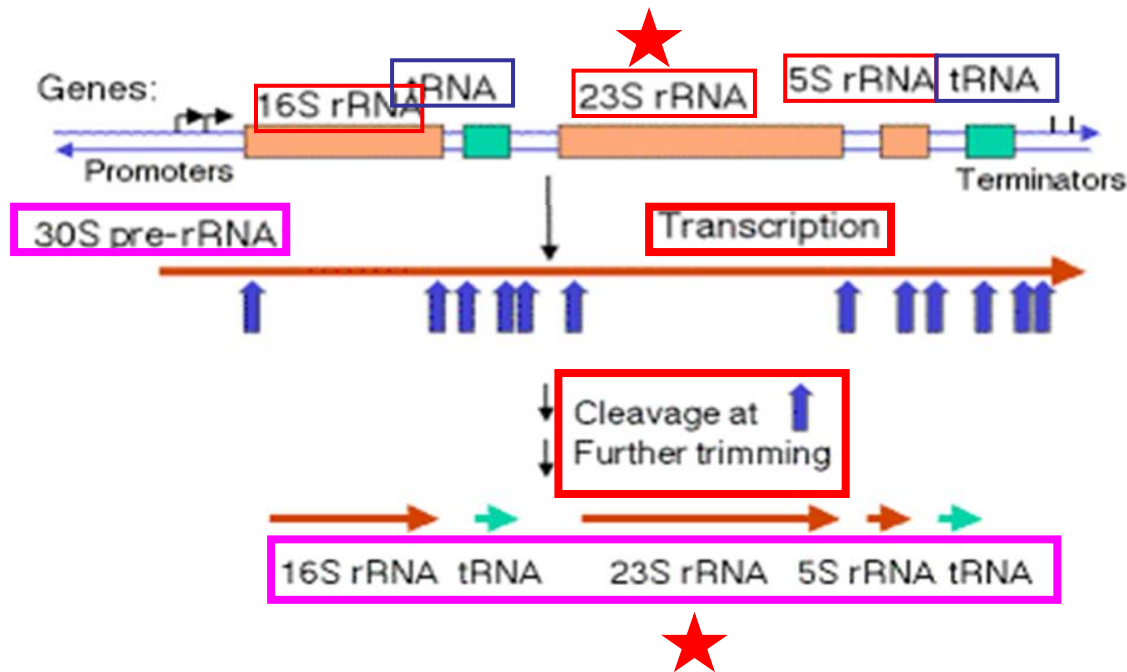




Q: rRNAの変異は何故起こるのか？

Ribosomal DNA (rDNA) (ribosomal RNA Operon: *rrn*) and Ribosomal RNA (rRNA)

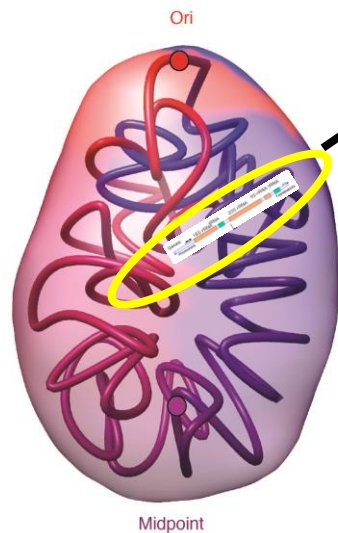
Ribosomal DNA (rDNA) (Ribosomal RNA Operon: *rrn*)
= coding for ribosomal RNA (rRNA) (rRNA塩基配列をコードしたDNA)



Ribosomal DNA (rDNA)

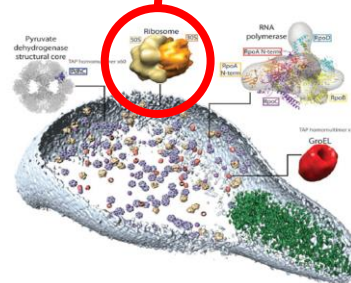
(ribosomal RNA Operon: *rrn*)

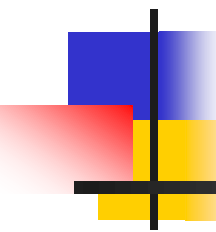
Biophysic property	<i>M. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
Number of DNA bases	1,632,788	9,279,350
Number of rDNA	1	7
Number of ribosome	300	6,800 – 72,000



1個のrDNAの変異は300
個全てのrRNAに影響す
る。
(rDNAの変異は決定的)

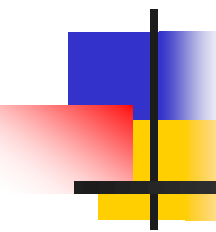
1個のrDNAの変異は、他
の6個が正常なら影響は
1/7と少ない。





Q: rRNAの変異は何故起こるのか？

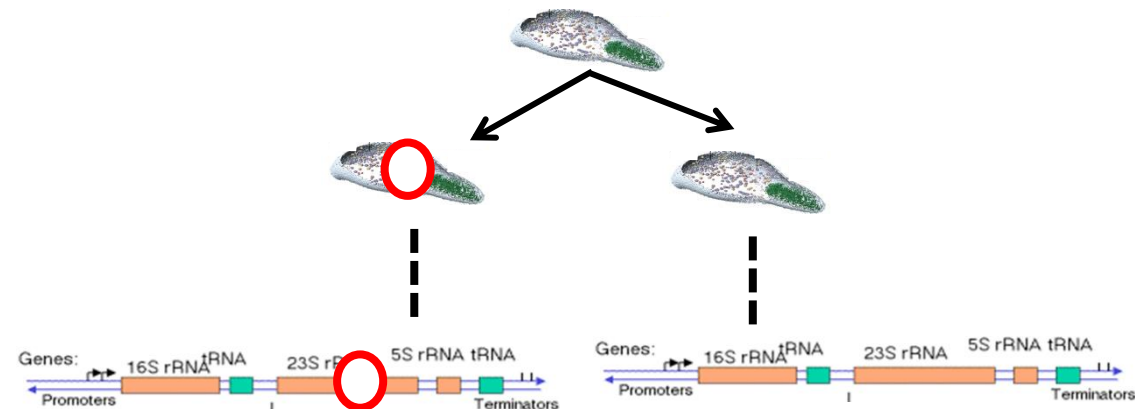
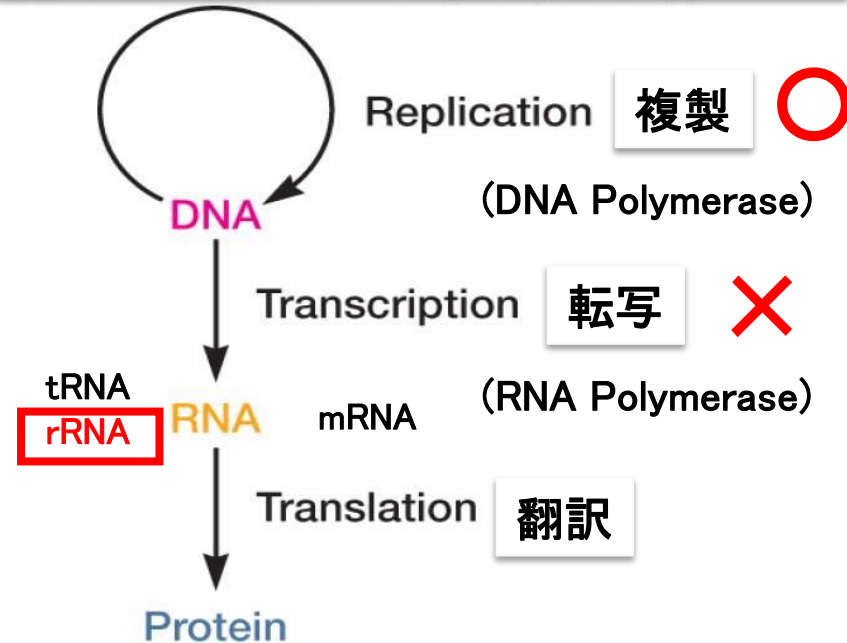
A: 23 rRNA 変異はrDNA の変異の結果である。



Q: rDNAの変異はいつ起こるのか？

rDNAの変異変異はいつ起こるのか？

Central dogma of molecular biology

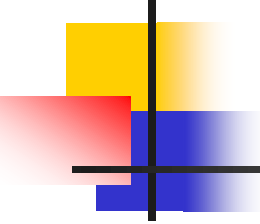


Ribosomal DNA (Ribosomal RNA Operon)

A: rDNA の変異はマイコプラズマのDNAの複製の時に起こる。

**Q: rDNA変異を起こすのにどのくらいの期間
がかかるか？**





rDNA変異の起こる確率

- Doubling time : **8 hours** (*E. coli*: 0.33 h) (Incubation period: 1~4 weeks)
- a circular DNA; 1.6×10^6 bases
- Mutation rate of DNA is $10^{-7} \sim 10^{-11}$ /base/replication.
(1回の複製で $10^7 \sim 10^{11}$ 塩基の1塩基に変異:
1 base mutation/ $10^7 \sim 10^{11}$ bases/replication)
(RNA: $10^4 \sim 10^6$ bases/replication)



**Q: rDNA変異を起こすのにどのくらいの期間
がかかるか？**

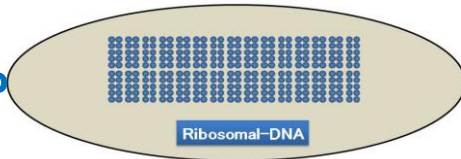
**A: MRSPが1個誕生するには少なくとも7-10日必要であり、
この変異は抗菌薬使用と関連なく生じる。**



Q: rDNAが変異を起こした後、300個のリボソーム
が全て変異リボソームになる期間は？

300個のribosomal RNA

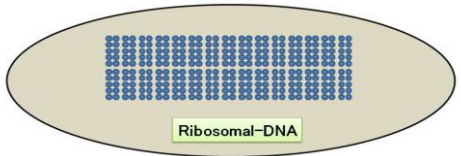
MSMP



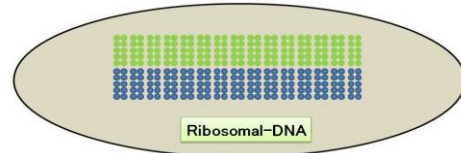
Ribosomal-DNA

300個のrRNA中で何個のrRNAが変異したら、耐性になるかは不明。

rDNAの変異

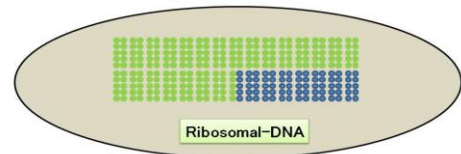


Ribosomal-DNA



Ribosomal-DNA

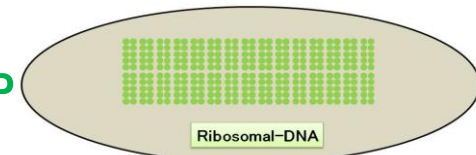
8時間:1回の複製: 1/2がMRMP



Ribosomal-DNA

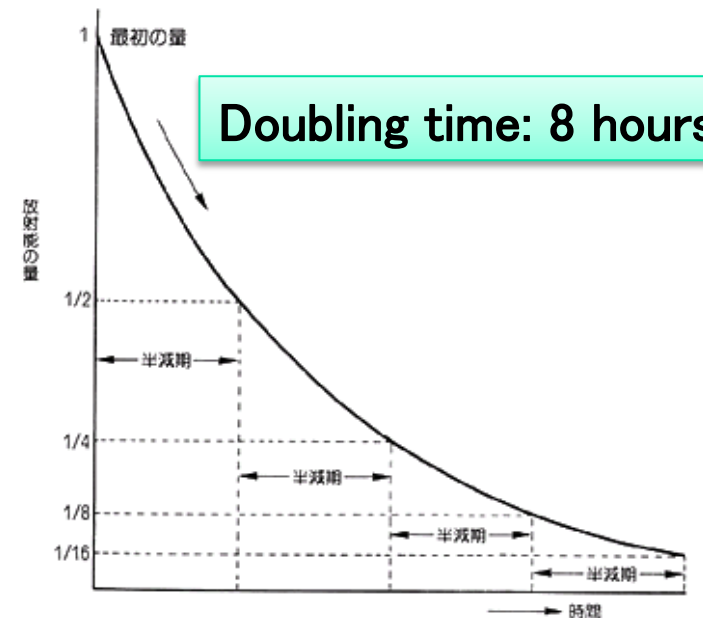
16時間:2回の複製: 3/4がMRMP

MRMP



Ribosomal-DNA

全てのrRNAが変異し耐性が完成

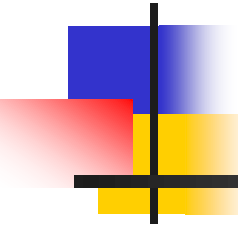


8時間 16時間 24時間



Q: rDNAが変異を起こした後、300個のリボソーム
が全て変異リボソームになる期間は？

A: rDNAの変異は決定的で1日くらいと短期間



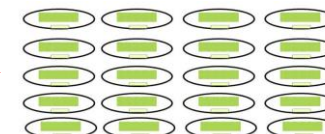
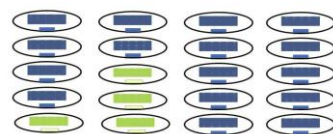
Q: MRMPが1個誕生したら、どうなるか？

MRMPが1個誕生したら、どうなるか？

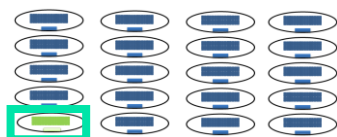
生き残れるかは、マクロライドが必要

マクロライド使用 (Drug pressure)

全てMRMP



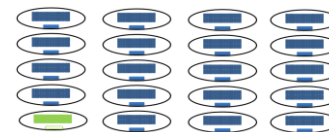
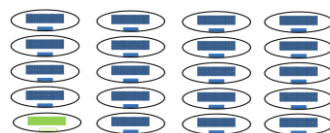
Quasispecies ?



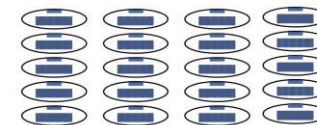
MRMP

マクロライドの存在と
関連なく誕生

マクロライド使用なし



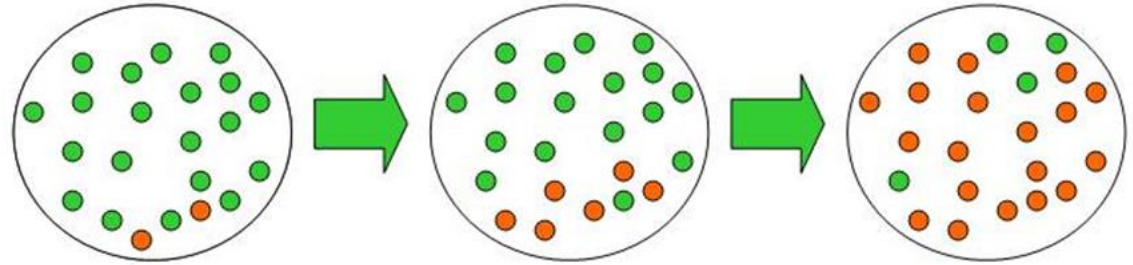
MRMPは残存



MRMPは消失

Growth advantageはないだろう

耐性菌にGrowth advantageがあれば、
もっと早期に耐性マイコプラズマが出現していた。



マイコプラズマ肺炎でQuasispeciesはあるのか？

Quasispecies (多種性)

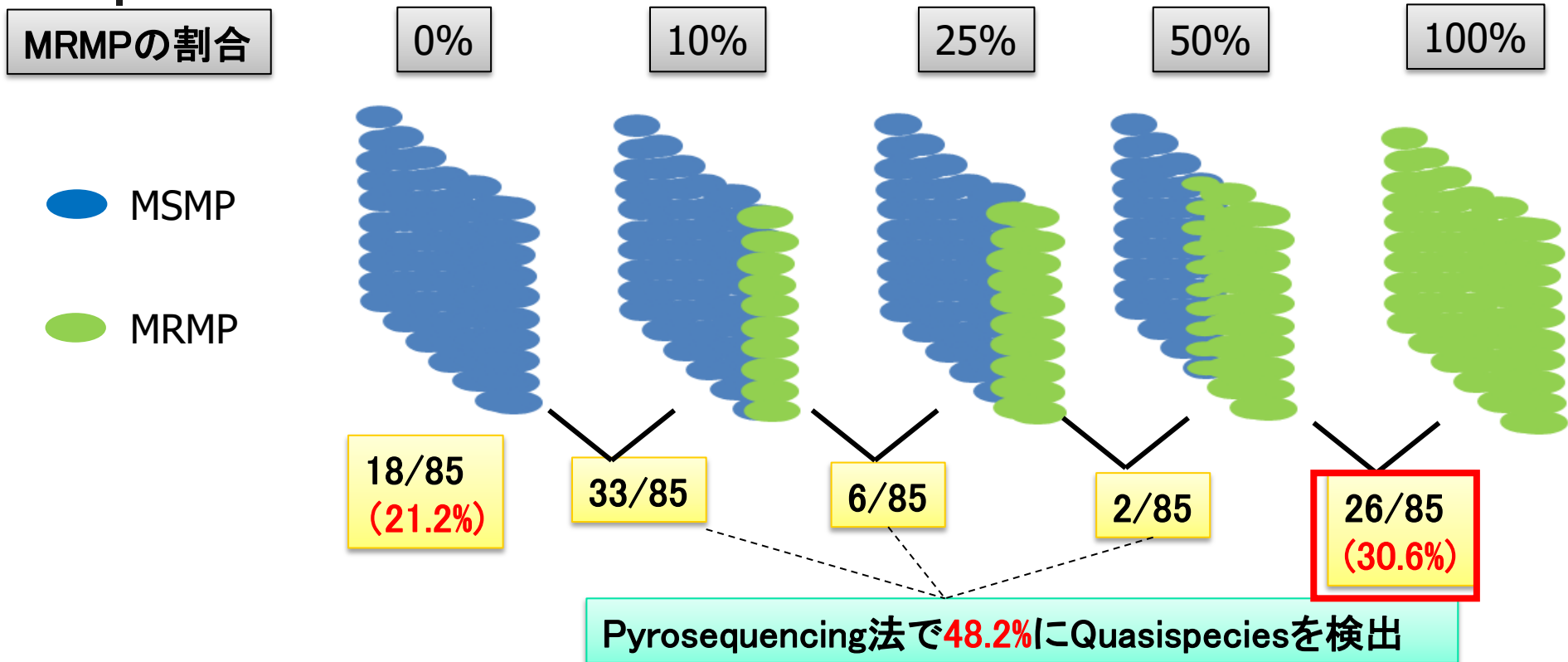
「類似した(=Quasi) + 種(=species)」

(MSMP+MRSPのMixture)

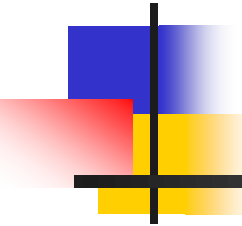
マイコプラズマ肺炎患者

-Pyrosequencing法によるマイコプラズマ耐性遺伝子変異の
Quasispeciesの検出-

Quasispeciesが多数存在

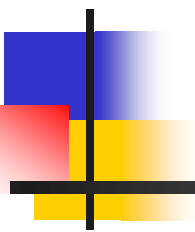


従来の Sanger sequencing法または Simple Probe PCR法
では30.6%しか変異を検出できなかった。



Q: MRMPが1個誕生したら、どうなるか？

A: 変異はマクロライドの存在と関連なく誕生するが、
生き残るには、マクロライドが必要。
Quasispeciesの時期を経過する。



Q: 1回のマイコプラズマ肺炎に対する、マクロライド治療でMRMP肺炎は生じるのか？



マイコプラズマ肺炎の治療で耐性が発症したとの報告がある *de novo* mutation

in vivo

in vitro

マイコプラズマ肺炎の治療で耐性が発症した報告 *de novo* mutation *in vivo*-1

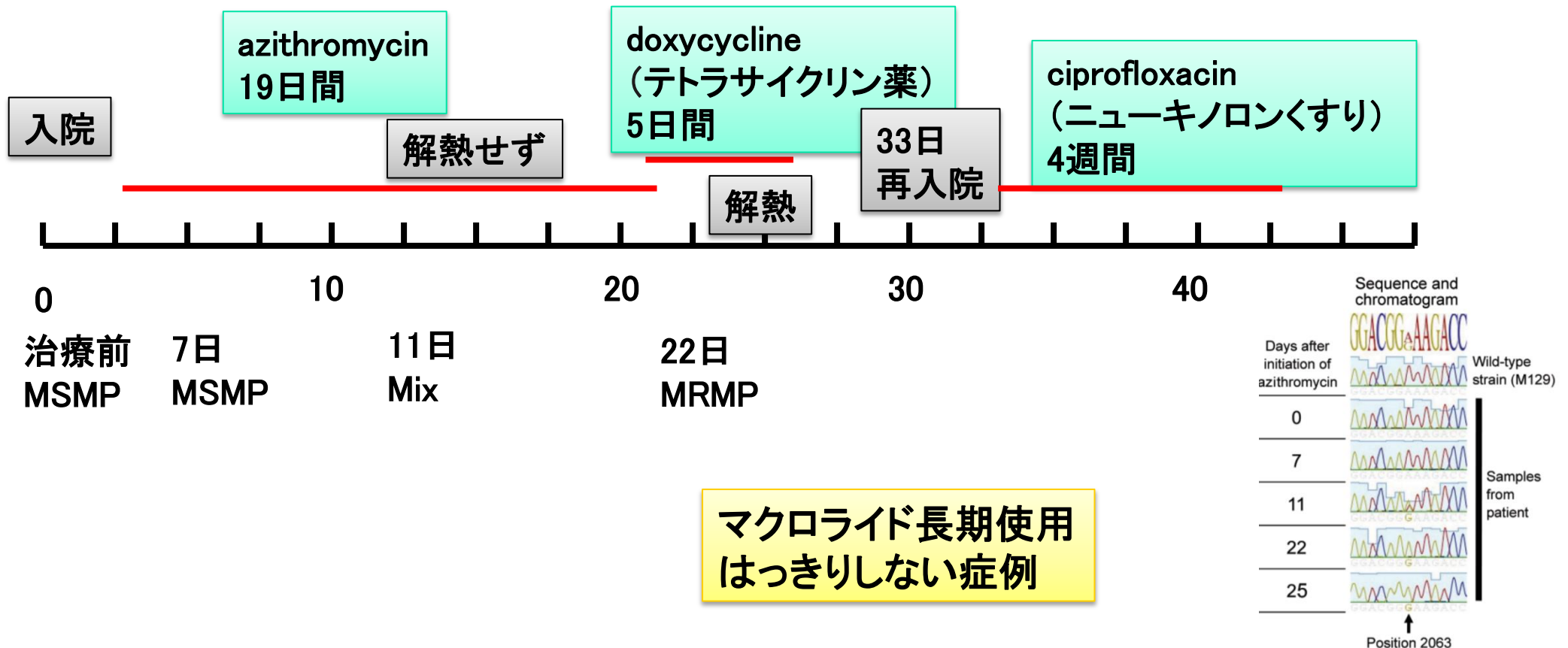
- Emerg Infect Dis 2011; 17: 1079–1082
 - 9/30: A2063G mutation
 - 2/9: a **mixed population** of both resistant (A2063G) and sensitive (A2063) (Quasispeciesの存在)
 - 1/9: *de novo* mutation: 6-year-old boy

Quasispeciesの2例と*de novo* mutationを疑わせる症例

マイコプラズマ肺炎の治療で耐性が発症した報告 *de novo* mutation *in vivo*-1

■ Emerg Infect Dis 2011; 17: 1079–1082

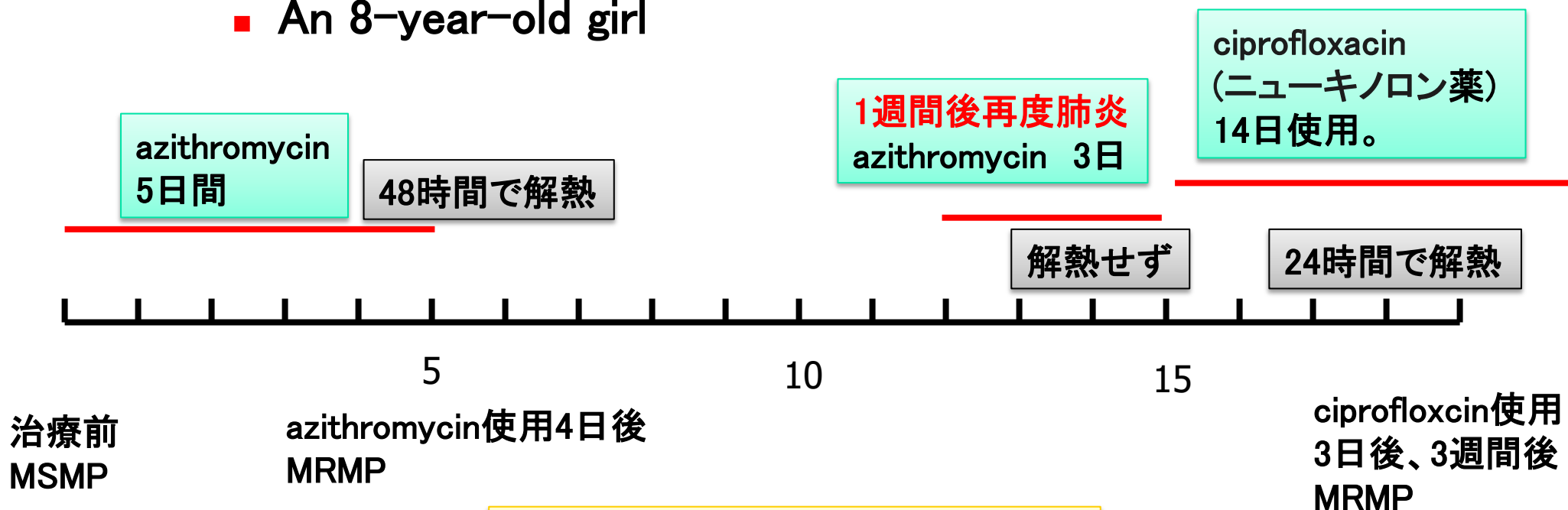
■ A previously healthy 6-year-old boy が呼吸器感染症発症26日後に入院(細菌)



マイコプラズマ肺炎の治療で耐性が発症した報告 *de novo mutation in vivo-2*

■ Ped Infect Dis J 2012; 31: 1210

■ An 8-year-old girl



MRMPの誕生が早すぎる？
始めから少量のMRMPが混在？
そのため、1週間後に再燃？

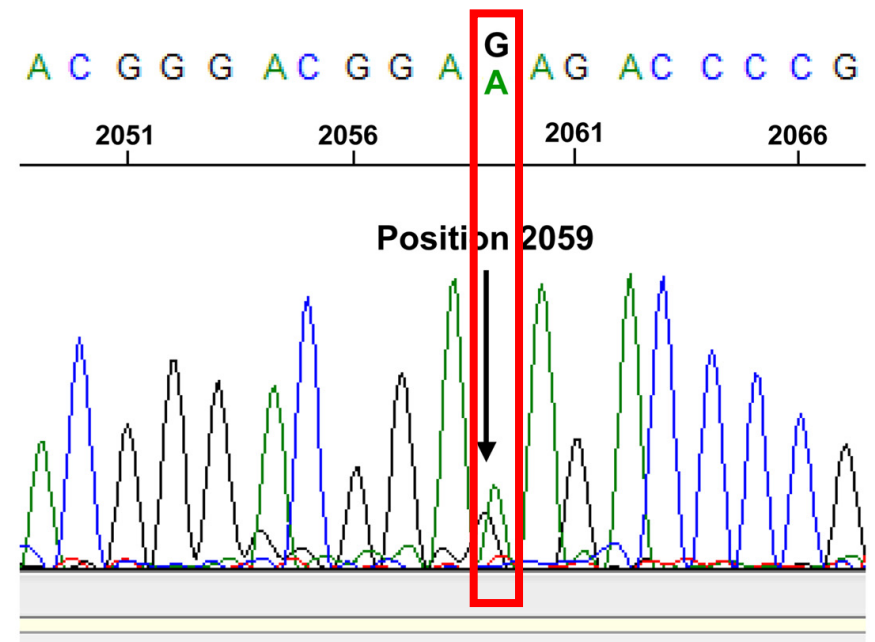
マイコプラズマ肺炎の治療で耐性が発症した報告 *de novo* mutation *in vivo*-3

- J Clin Micro 2012; 50: 3402-5
 - A child **with Job's syndrome**
 - josamycin (16員環) during 3 weeks + roxythromycin (14員環) 4 weeks

Day 7: A2059A (wild type)

Day 55: **Mixed population** of A2059A (wild type)
and A2059G (resistant type)

The same multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) type (MLVA type I)



免疫不全症で長期間マクロライドを使用しMRMPが誕生し、55日目にQuasispeciesの存在

マイコプラズマ肺炎の治療で耐性が発症した報告 *de novo* mutation *in vivo*-4

- J Med Microbiol 2013; 62: 1876-1882
 - 6/32 (19%): MRMP
 - 4/6: *de novo* mutation

マクロライド使用期間不明
再増悪時にMRMPが検出
始めからMRMPが存在？

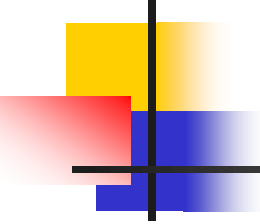
小児	入院/外来状況		マクロライド感受性	Antibiotics
乳幼児	初診	(4日間入院)	感受性	Clarithromycin
	4週後に再受診	(3日間入院)	耐性 (A2063G)	Clarithromycin
学童	初診	(外来)	感受性	Clarithromycin
	2週後に再受診	(外来)	耐性 (A2063G)	Clarithromycin
学童	初診	(9日間入院)	感受性	Azithromycin
	10週後に再受診	(16日間入院)	耐性 (A2064G)	不明
乳幼児	初診	(免疫不全症で入院)	not done	不明
	3週後		感受性	
	10週後		耐性 (A2064C)	

最初の治療で解熱改善後、増悪し再入院時にMRMPを検出。

マイコプラズマ肺炎の治療で耐性が発症した報告 *de novo* mutation *in vivo*-5

- Scand J Infect Dis 2014; 46: 315–319
 - 51-old woman
 - Roxithromycin (14員環マクロライド薬) 10日間
 - 6日: 変異なし; 17日: A2058G
 - The selection of **pre-existing macrolide resistance** or the development of *de novo* macrolide resistance, **although rare**, does occur during macrolide treatment.

Quasispeciesの存在、もしくは稀ではあるが*de novo*変異の可能性？



de novo mutation *in vivo* のまとめ

- 1回のマクロライド肺炎に対する通常の治療で明らかに *de novo* mutation が起きて治療に反応しない症例はなかった。
- マクロライド使用期間が長期間の症例もしくは不明の症例での報告はある。
- 免疫不全ではMRMP誕生の危険は高いと思われる。
- 多くは、最初の感染からMRMPが混入していた可能性が高い。
(Quasispeciesの存在を疑わせる症例が多い。)
- 最初の感染に少量のMRMPが混入していたと思われる症例は、治療には反応するが、残存したMRMPが治療終了後に増加して、数週間後に再燃し、MRMPによる肺炎として発症する症例がある。



de novo mutation *in vitro*

- Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 460–465: **実験室株**
 - MRMP were selected in vitro from the susceptible **reference strain M129**, by **23 to 50 serial passages** in subinhibitory concentrations of macrolides and related antibiotics
 - Erythromycin A, Azithromycin: C2611A mutation
 - Josamycin: A2063G mutation

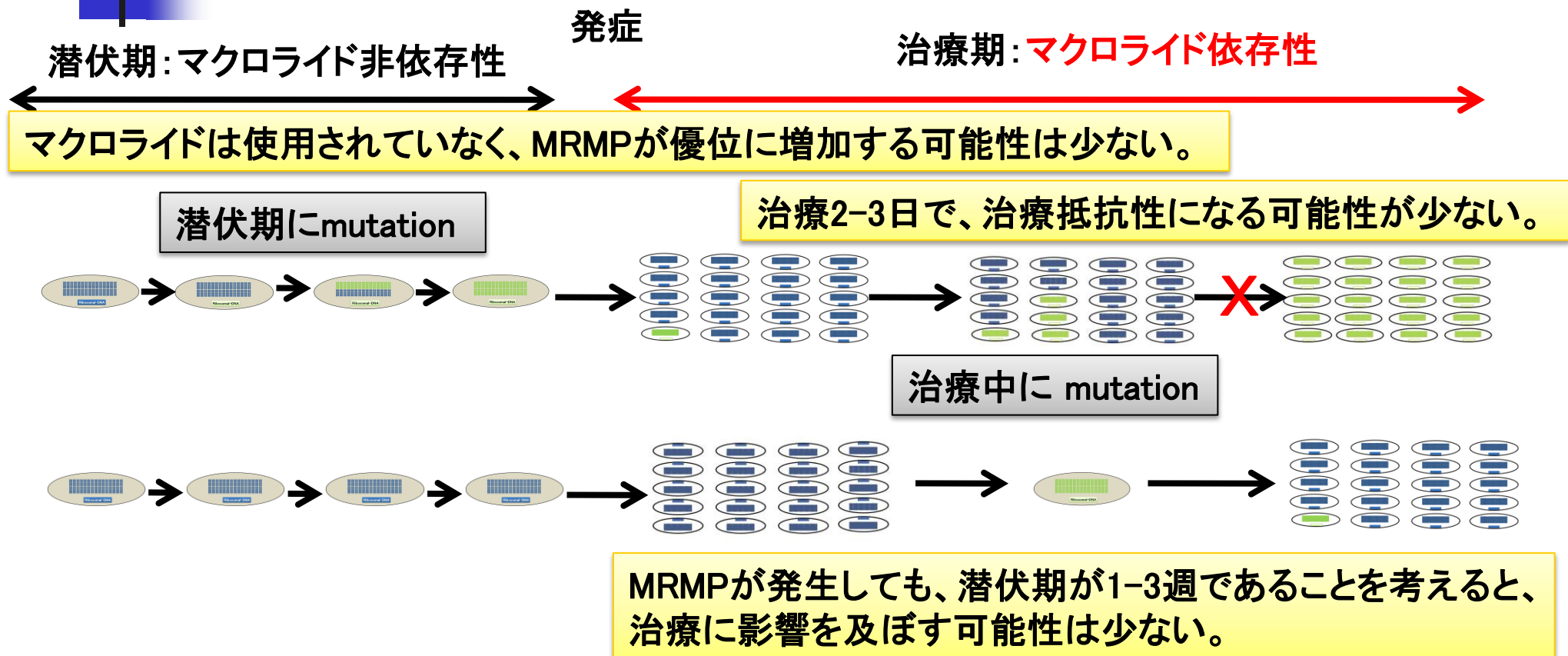
実験室株でMRMPは誕生するのにマクロライド存在下で23～50 passagesが必要。

- Microbiol Immunol 2001; 45: 617–620: **野生株**
 - **Eleven (7.8%)** of the 141 EM-sensitive isolates grew in the medium containing 100 μ g/ml of EM during incubation **for 10 to 28 days**.
 - Among 11 EM-resistant strains that grew in the medium, point mutations in the 23S rRNA were found in 3 strains at A2063G, 5 strains at A2064G and 3 strains at A2064C.

野生株では10～28日と短期間で耐性が誕生した。

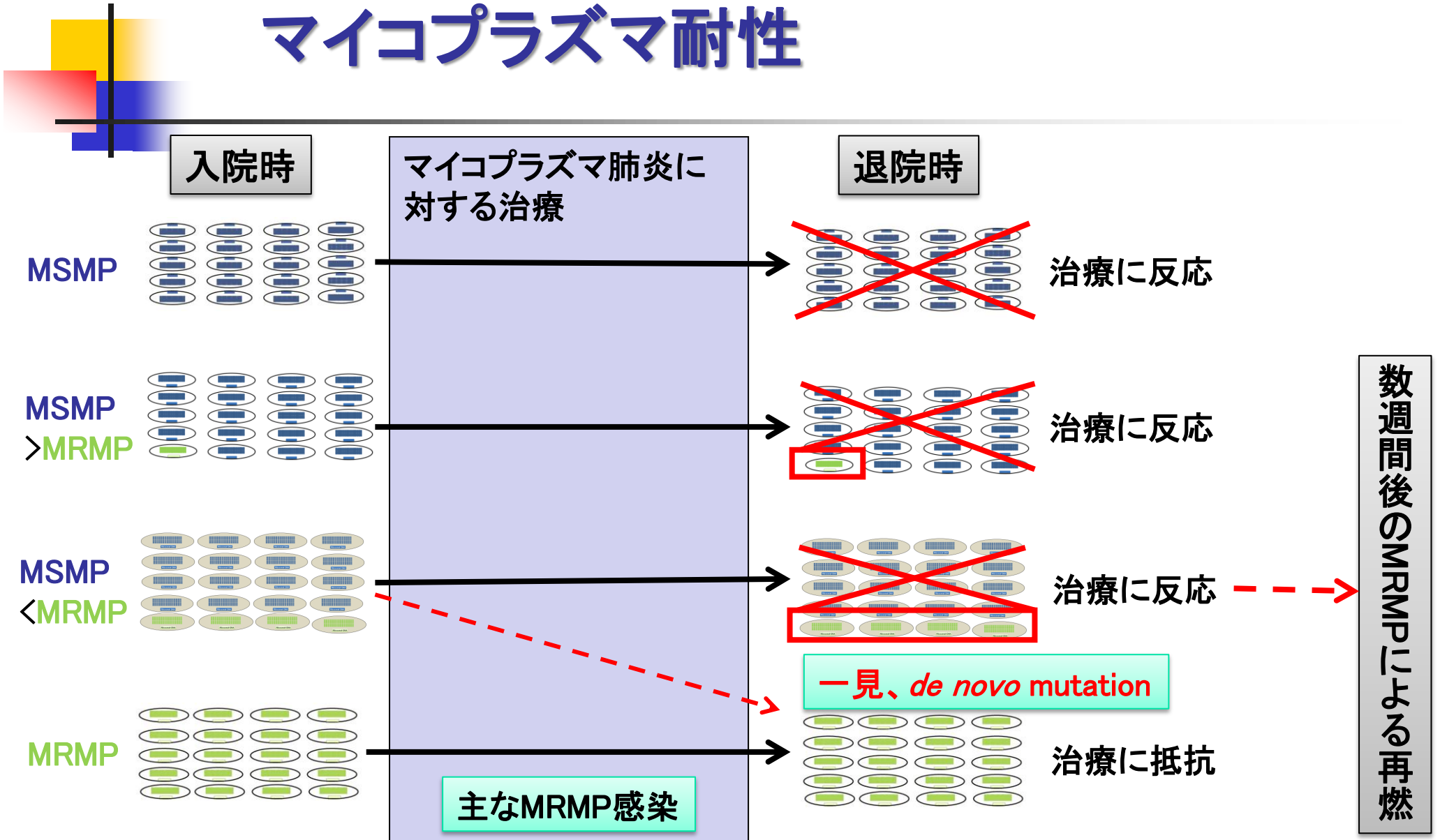
野生株にMRMPが少量混ざっていた可能性が考えられる。

潜伏期、治療中にMRMPが出現した時、治療に影響を与えるか？



潜伏期や治療中に *de novo* mutation が発症して、治療に影響を及ぼす可能性は少なく、MRMPに感染して発症している可能性が高い。

マイコプラズマ肺炎治療前後の マイコプラズマ耐性





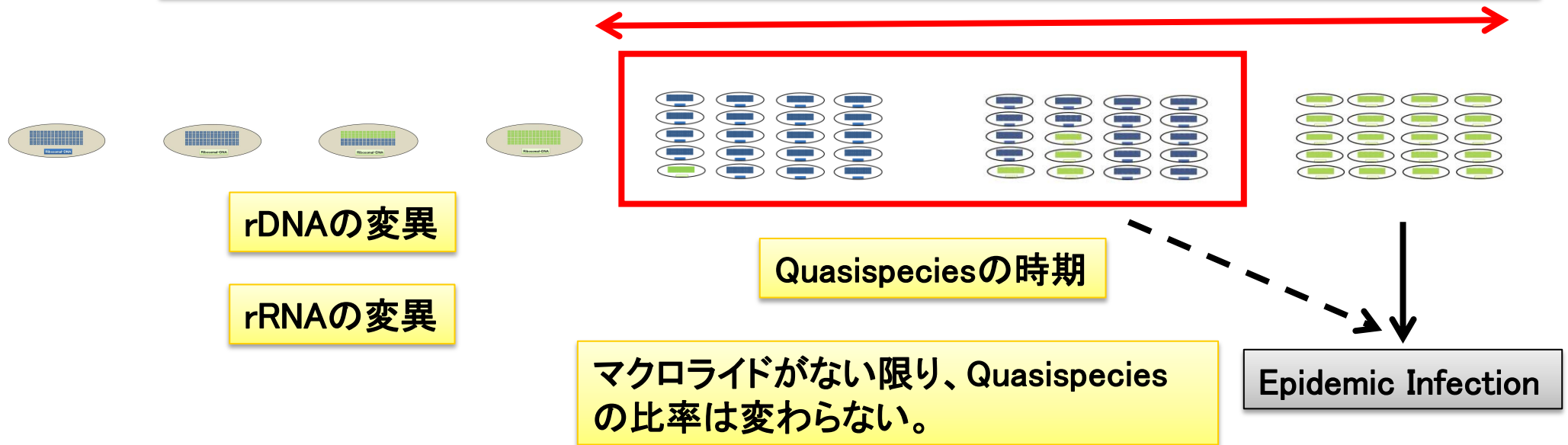
Q: 1回のマイコプラズマ肺炎に対する、マクロライド治療でMRMP肺炎は生じるのか？

約45年MRMPは流行しなかった。
マクロライド系薬の効果は、投与後 2～3 日以内の解熱で概ね評価できる。→ 2～3 日で全てのMSMPがMRMPになることはないと推測される。

A: MSMPに感染して、通常の短期間の治療でMRMP肺炎は発症しない。

Q: MRMPが生まれるためには、何が必要か？

マイコプラズマは他の細菌に比べ、増殖が遅いため、MRMPが優位に増殖するためには長い間のDrug pressureが必要である。



A: MRMPが増えていくためには、長期間のマイコプラズマ保菌者に対する長期間のマクロライド使用が必要。

Q: マイコプラズマが長期間マクロライドに暴露される場所はあるのか？

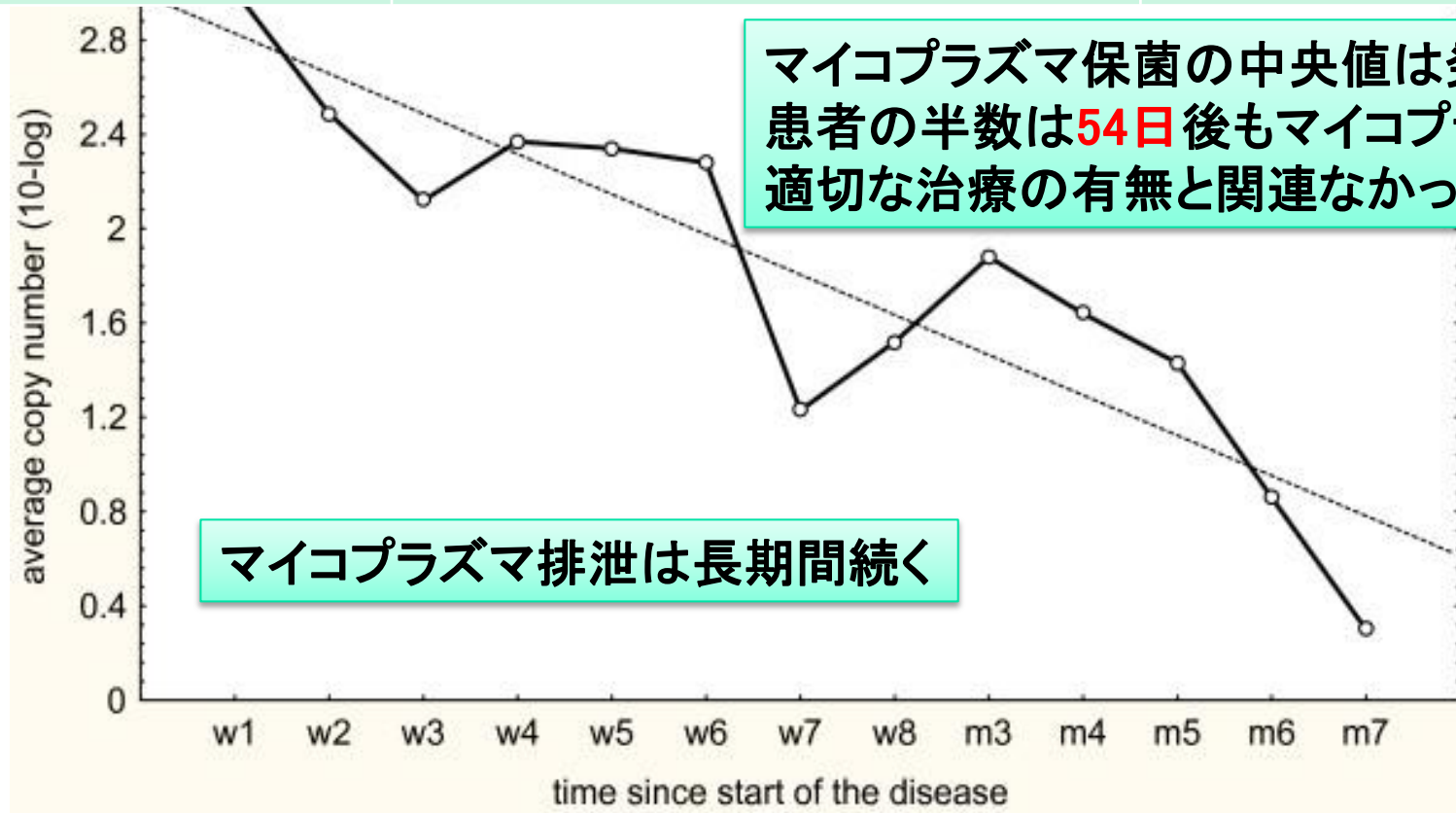




マイコプラズマ感染後にマイコプラズマ排泄期間

Geometric mean values of MP load by quantitative PCR (qPCR) at different time points after onset of illness. (longitudinal follow-up of **53** patients with **respiratory infection by MSMP**)

	43 cases treated with antibiotics	10 untreated cases
Median period of persistence of MP	52 days (range 2–229)	45 days (range 1–116)



マイコプラズマ保菌の中央値は発症後**7週**。
患者の半数は**54日**後もマイコプラズマ検出。
適切な治療の有無と関連なかった。

マイコプラズマ排泄は長期間続く

M. pneumoniae DNA loads in the longitudinal study

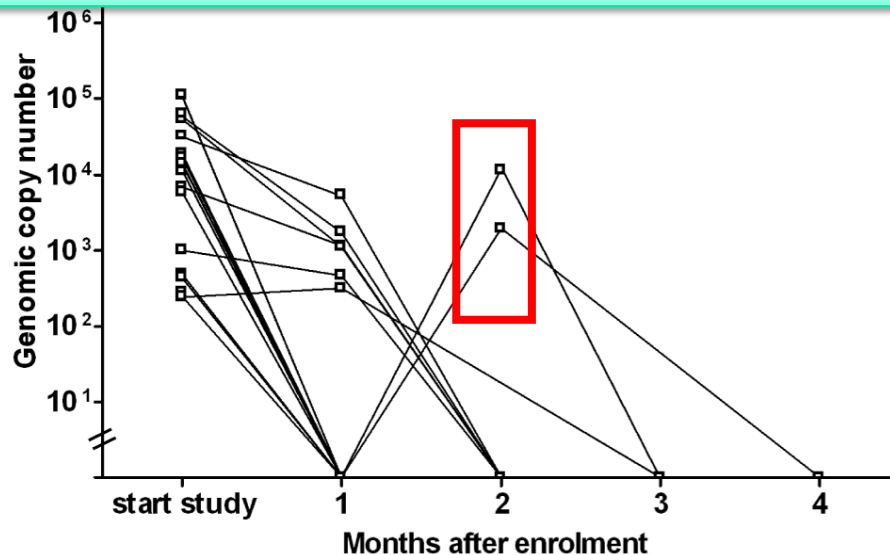
3ヶ月～16歳の無症状の小児405名 急性呼吸器感染症の小児321名

M. pneumoniae DNA: 無症状: 急性呼吸器感染症 = 21.2% : 16.2% (p=0.11)

A Asymptomatic (21名)

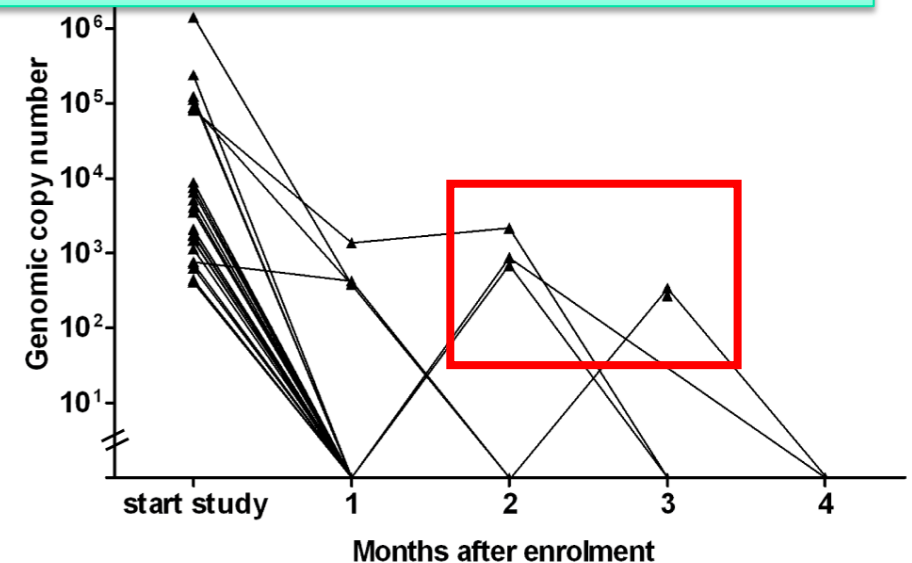
B Symptomatic (22名)

マイコプラズマ感染者は、無症状患者も数か月間マイコプラズマを排泄している症例がある。

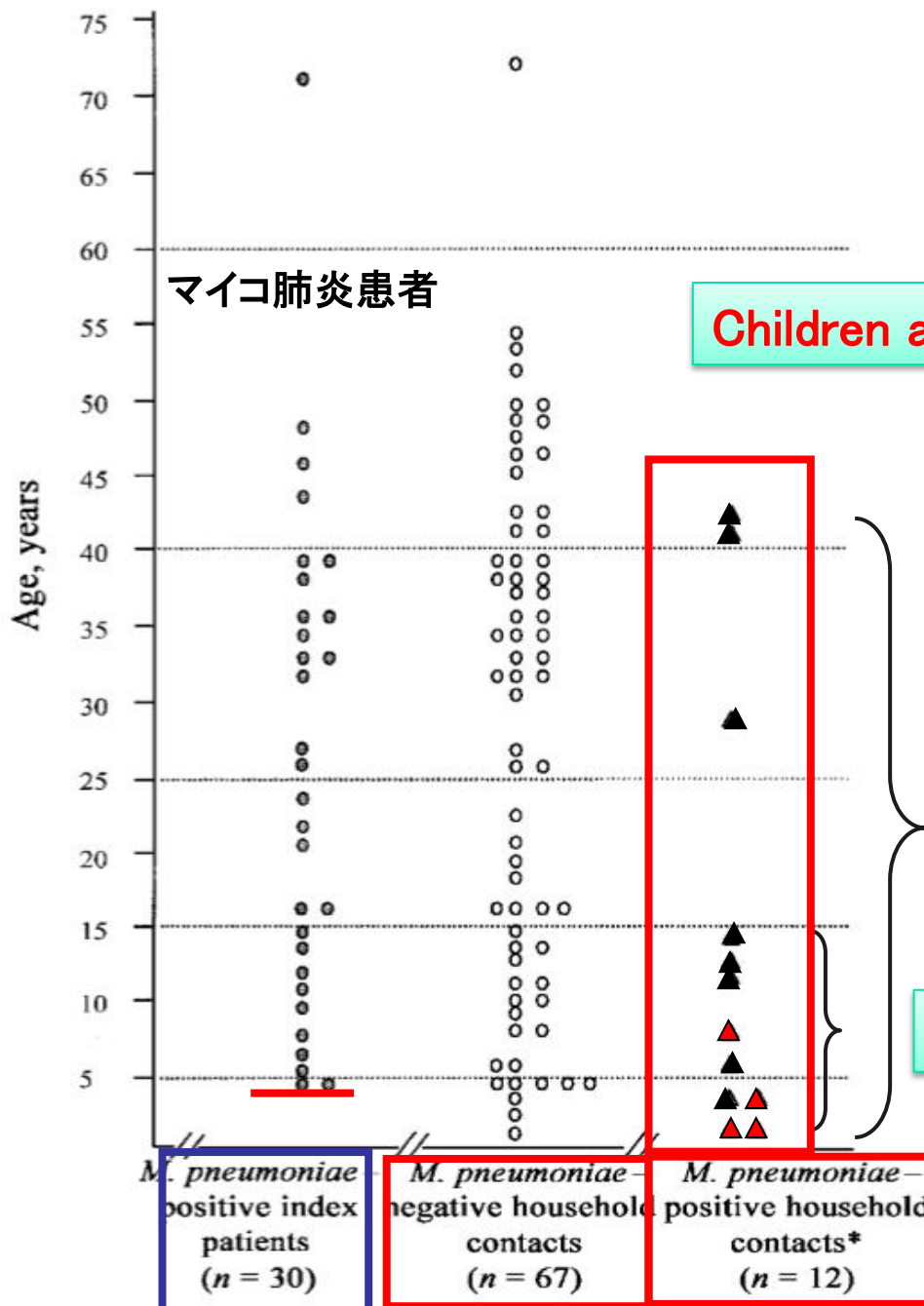


1M: 9/43 (21%)

3M: 3/43 (7%)



家族内感染

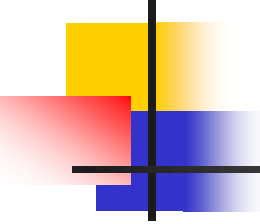


Children are a relevant reservoir for *M. pneumoniae*.

マイコプラズマ肺炎患者30名の
家族内接触があった79名
Myco DNA (-): 67名
Myco DNA (+): 12名

12名の中で9名 (75%)は小児
小児9名の中で無症状は4/9 (44%)

家族内感染は、小児が多く、約半数は無症状



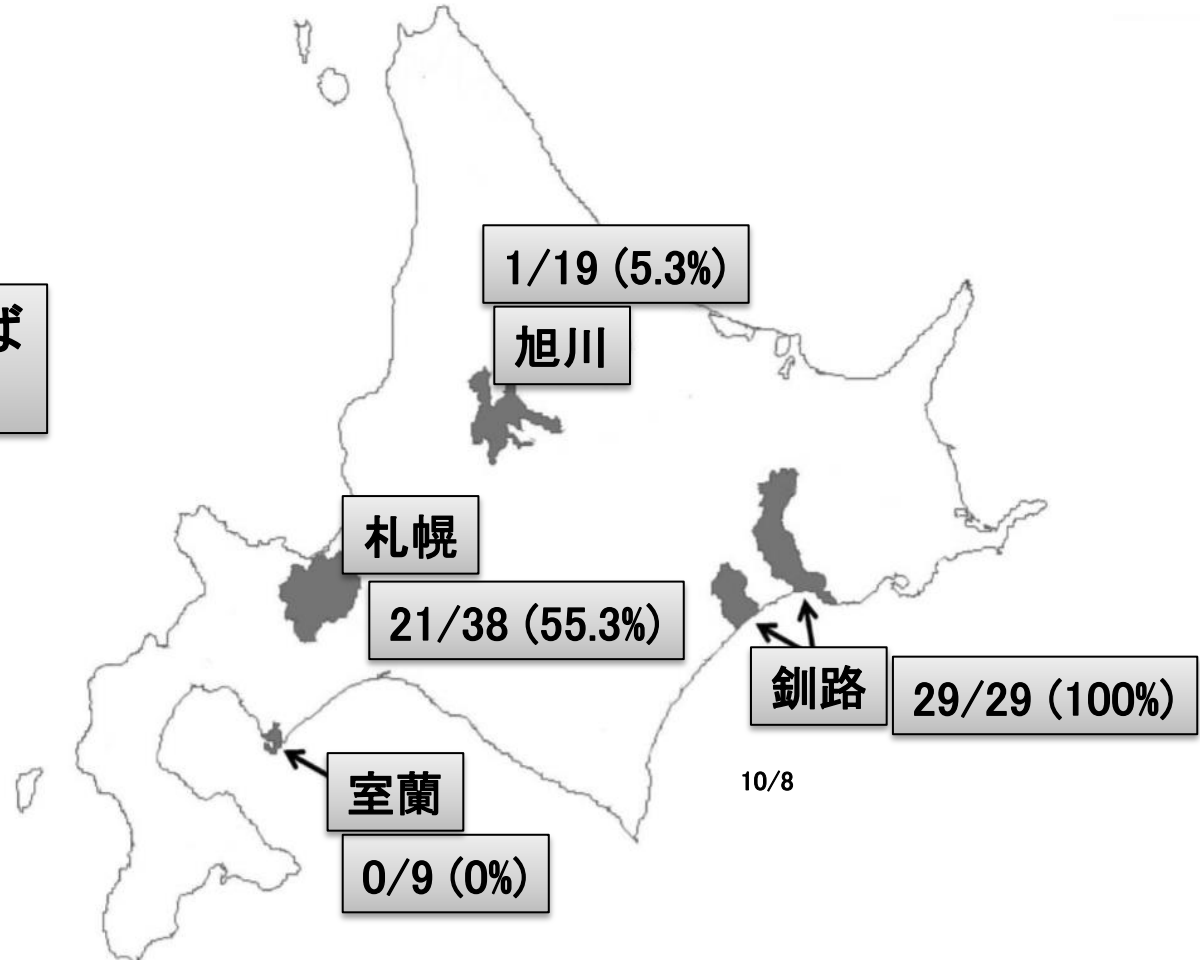
マイコプラズマ感染後にマイコプラズマ排泄期間

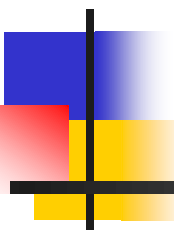
- マイコプラズマ肺炎の流行期には、上気道炎や無症状の子どもが多く存在する。
 - Scan J Infect Dis 1992; 24: 161-4
 - J Infect Dis 2001; 183: 675-678
 - PLoS Medicine 2013; 10: e1001444
- マイコプラズマ感染後、治療の有無に関わらず長期間マイコプラズマを排泄している。
 - BMC Microbiology 2008; 8: 93
 - PLoS Medicine 2013; 10: e1001444
 - Scan J Infect Dis 2014; 46: 315-9
 - Antimicrob Agents Chemother 2016; 60: 4310-4314

Regional differences in prevalence of MRMP among children in Hokkaido, Japan

北海道の4市（2009年11月～2011年8月）のマクロライド耐性マイコプラズマ

マクロライドを長期間使用すれば
どこでも誕生する。

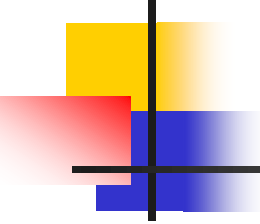




Q: マイコプラズマが長期間マクロライドに暴露される場所はあるのか？

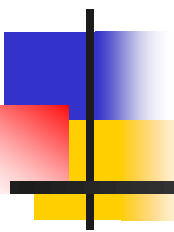
A: 小児のマイコプラズマ長期保菌者に、マイコプラズマの治療ではなく長期間マクロライドを使用する機会が増えているのでは？（副鼻腔炎、中耳炎）

無症状の保菌者の多いA群溶血性連鎖球菌、ヘリコバクターピロリ菌もマクロライド耐性誕生に長期間マクロライド使用が考えられる。



マクロライド耐性MRMP誕生のまとめ

- MRSPは、
 - マイコプラズマ複製の過程でribosomal DNA (rDNA)にマクロライド使用と関連なく変異が生じた結果、rRNAに変異が起きる。
 - 但し、マイコプラズマはrDNAに変異が起こりにくく、長期間がかかる。
- MRMP肺炎は、
 - MRMPもしくはMRMPの多いQuasispeciesのマイコプラズマに感染して発症する。
 - 肺炎発症後の通常のマクロライド使用により、*de novo*変異を起こしMRMP肺炎を発症する可能性は少ないと考えられる。
 - 肺炎の再燃に、残存するMRMPが関与している可能性がある。
- MRMPもしくはMRMPの多いQuasispeciesのマイコプラズマの誕生には長期間のマクロライドへの暴露が必要である。
 - 長期間のマクロライドの暴露は、長期間マイコプラズマを排出している、小児（特に幼少児）の保菌者に対する長期間のマクロライド使用が考えられる。
 - MRMPを減らすためには、長期間のマクロライド使用を控える必要がある。



治療の問題点

TosufloxacinはMRMPに有効か？

Tosufloxacin、Minocycline の治療期間は？

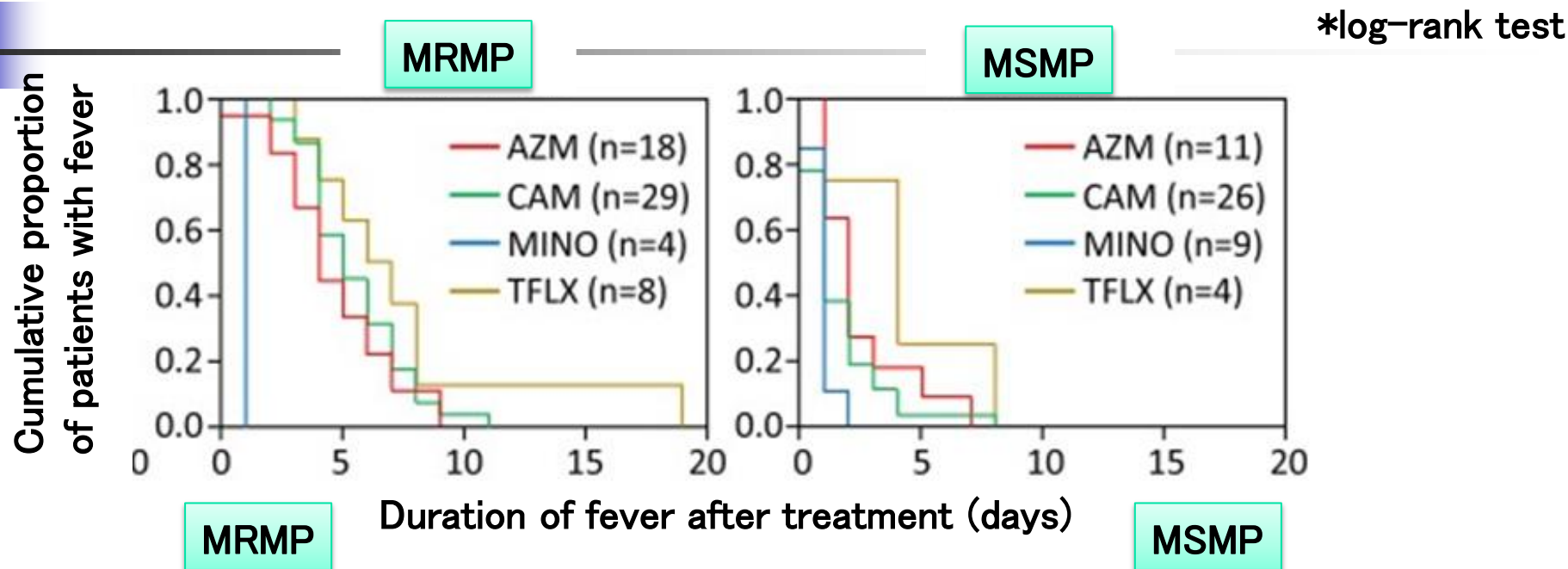
マイコプラズマ肺炎に対する経口抗菌薬

トスフロキサシン肺炎で保険適応。長くても7日が良い？

MINOの使用期間は通常3日，長くても5日以内とし，その後は自然治癒力に期待した方がよい？

Antibiotics 抗菌薬	Dosage 用法・用量	Medication period 投与期間
Erythromycin (EM) First choice: macrolides	25～50mg/kg/d、in four to six times	14 days
Clarithromycin (CAM)	10～15mg/kg/d、in twice to three times	10 days
Azithromycin (AZM) 阿奇霉素	10mg/kg/d、once	3 days
Tosufloxacin (TFLX) MRMPと考えられる時	12mg/kg/d、in twice	7～14 days
Minocycline (MINO)	2～4mg/kg/d、in twice	7～14 days

マイコプラズマ肺炎の治療後の解熱期間



	Antibiotics	n	Mean	SE
—	AZM	18	4.6	0.6
—	CAM	29	5.5	0.4
—	MINO	4	1.0	0.0
—	TFLX	8	7.5	1.8
	All	59	5.2	0.4

	Antibiotics	n	Mean	SE
—	AZM	11	2.5	0.6
—	CAM	26	1.7	0.3
—	MINO	9	0.9	0.2
—	TFLX	4	4.3	1.4
	All	50	1.9	0.3

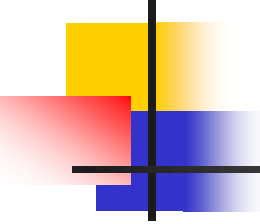
TosufloxacinはMRMPに無効

抗菌薬のMIC

Antimicrobial agent	MIC (μ g/ml) for MR <i>M. pneumoniae</i> (n=27)				MIC (μ g/ml) for MS <i>M. pneumoniae</i> (n=23)		
	Range	50%	90%		Range	50%	90%
Erythromycin	128 – >256	256	>256		0.002 – 0.0078	0.0039	0.0039
Clarithromycin	64 – >256	256	256		0.0005 – 0.0039	0.001	0.001
Azithromycin	16 – 128	32	64		<0.000125 – 0.00025	<0.000125	<0.000125
Tosufloxacin	0.13 – 0.25	0.25	0.25		0.13 – 0.5	0.25	0.5
Minocycline	0.13 – 1	0.5	1		0.13 – 2	0.5	1

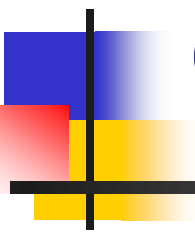
TosufloxacinのMICはMINOと同様にMSMPとMRMPに差はない

本研究にも矛盾がある



MRMPにTosufloxacin有効の報告

- Yasuhiro Kawai, ···. **Kazunobu Ouchi**. Therapeutic Efficacy of Macrolides, Minocycline, and Tosufloxacin against Macrolide-Resistant Mycoplasma pneumoniae Pneumonia in Pediatric Patients. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2013; 57: 2252-2258
- Miyuki Morozumi, Takafumi Okada, Takeshi Tajima, **Kimiko Ubukata, Satoshi Iwata**. Killing kinetics of minocycline, doxycycline and tosufloxacin against macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae. International Journal of Antimicrobial Agents 2017; 50: 255-257



Q: 今後、MRMPは減少するか？

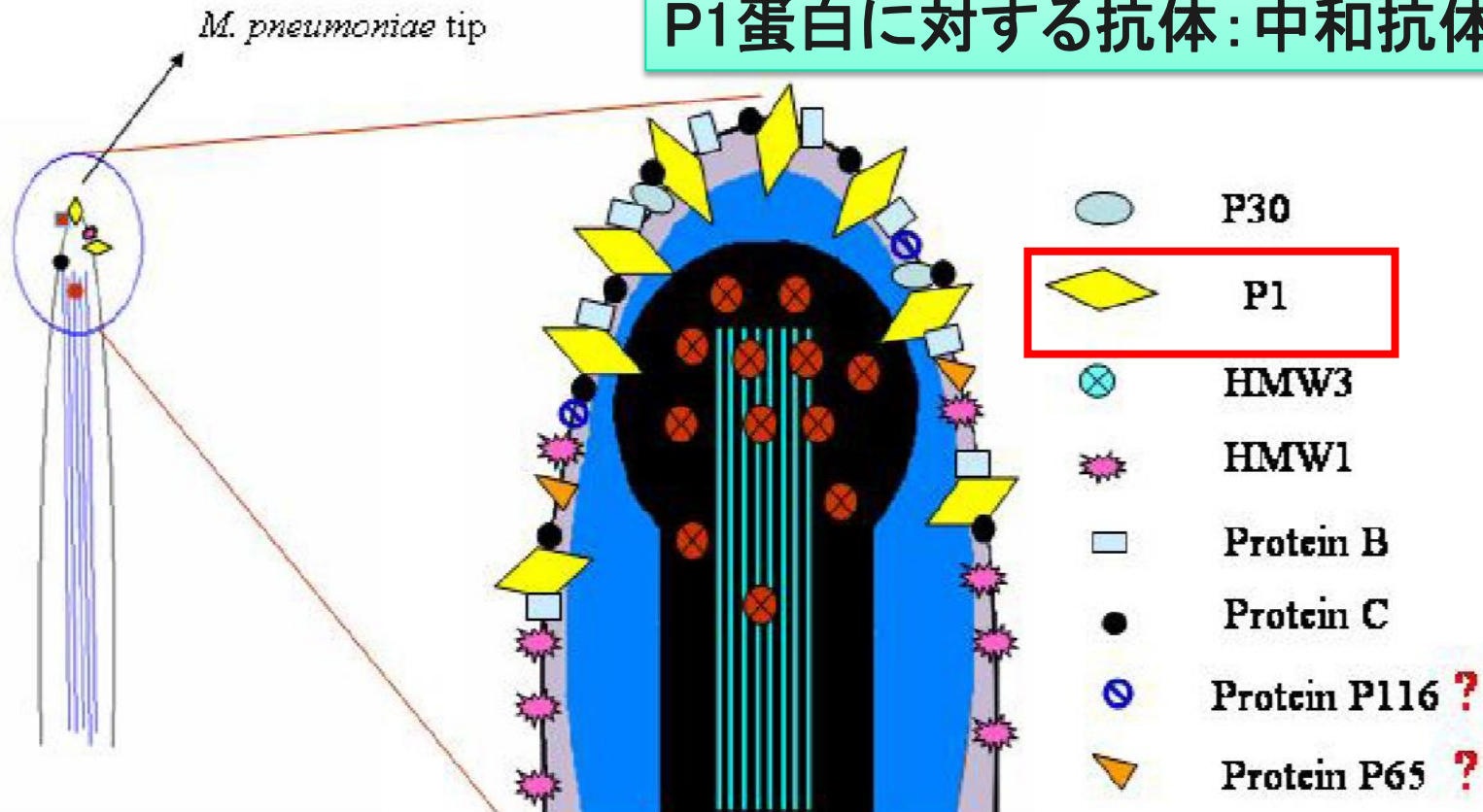
Tosufloxacin might have led to the decrease in incidence.

Tanaka T ..Kazunobu Ouchi Emerg Infect Dis 2017; 23: 1703–1706
(Tosufloxacin 2010 発売)

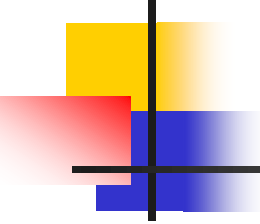
Schematic representation of *M. pneumoniae* cytoadherence and accessory proteins

**P1蛋白: 細胞レセプターに結合する
Adhesin protein.**

P1蛋白に対する抗体: 中和抗体



細胞と接着に多くのタンパクが関与

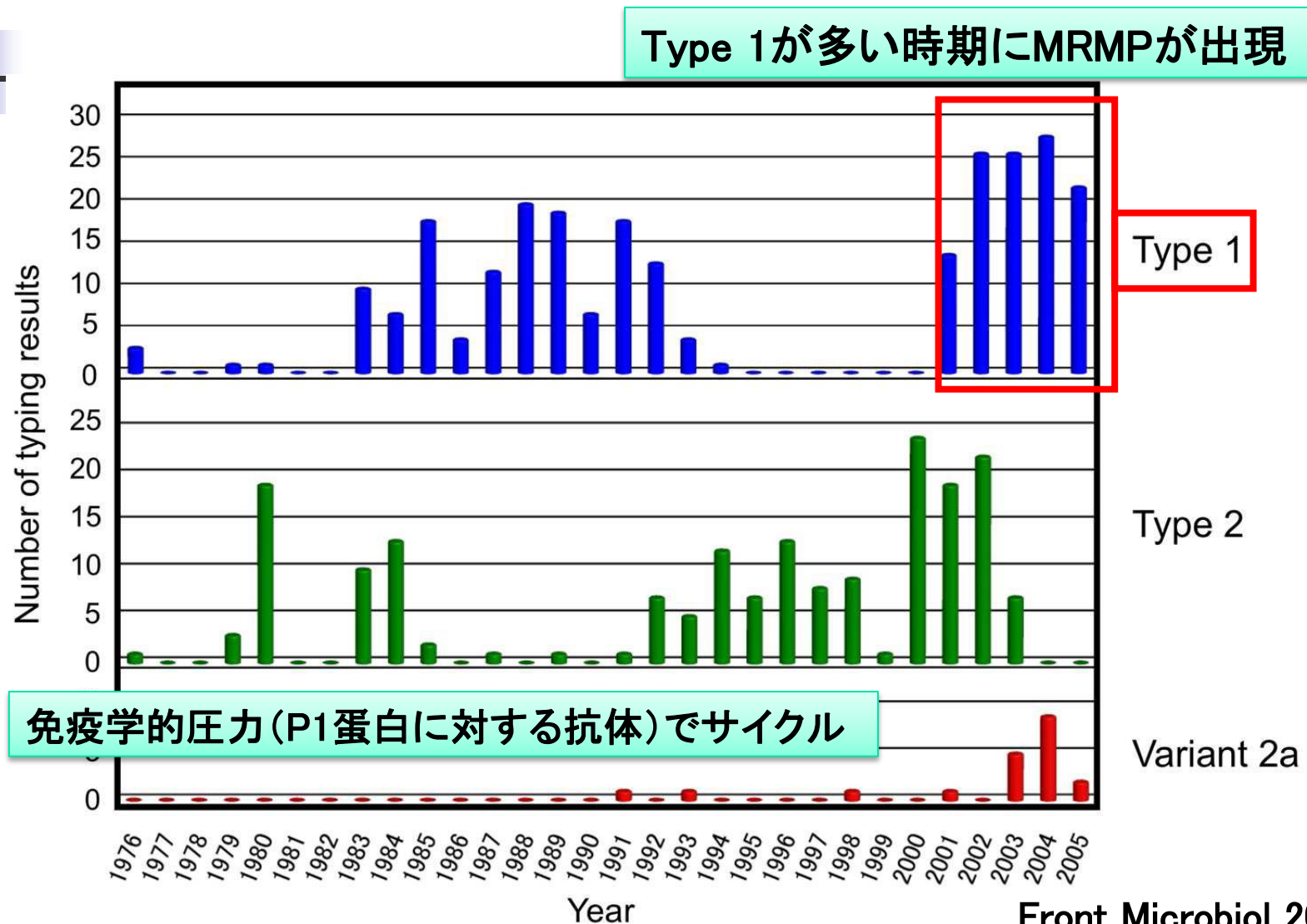


P1によるSubtypeの違いとMRMP

	マクロライド耐性マイコプラズマ(率)	
	type 1	type 2
Antimicrob. Agents Chemother. 2009; 53: 2160–2162	41/45 (91.1%)	1/6 (16.7%)
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2010; 67: 355–358	89/93 (95.7%)	1/7 (14.3%)
J Clin Micro 2013; 51: 2592–2598	25/46 (54.3%)	0/40 (0%)

MRMP はP1がtype 1に多い。

Typing analysis of the *M. pneumoniae* p1 gene from isolates detected in Japan between 1976 and 2005



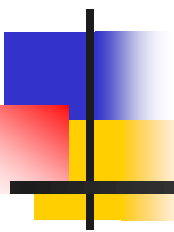
大阪府におけるマクロライド耐性肺炎マイコプラズマの検出率の低下傾向 肺炎マイコプラズマのP1遺伝子とマクロライド耐性率の経年変化

年	検出菌 株数	耐性菌 株数(%)	P1遺伝子型					
			1		2		2c	
			検出菌 株数	耐性菌 株数(%)	検出菌 株数	耐性菌 株数(%)	検出菌 株数	耐性菌 株数(%)
2013	6	4 (67%)	4	4 (100%)	0	0	2	0
2014	15	11 (73%)	11	11 (100%)	0	0	4	0
2015	158	66 (42%)	69	62 (90%)	47	0	42	5 (10%)
計	179	81 (45%)	84	77 (92%)	47	0	48	4 (9%)

最近、MRMPが減少

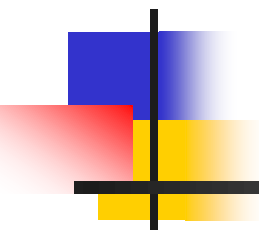
2015年から1型が減少し、2型が増加

MRMPの減少は抗菌薬の使用が変わったためではなく、MRMPの少ない2型が多くなってきた結果では？



Q: 今後、MRMPは減少するか？

**A. Type 2が増加してくれば、抗菌薬と関連なく減少していく可能性が高い。Type 2 に耐性を作らないことが重要。
長期間のマクロライド使用を控えることが必要。**



「小児科の話題」に戻る

<https://doctor.99soudan.net/index5.htm>