

[総 説]

急速に進行する市中呼吸器感染症原因菌における耐性化の本質

生方公子

北里大学大学院感染制御科学府&北里大学北里生命科学研究所 病原微生物分子疫学研究室

(平成 20 年 5 月 9 日受付)

先の第 19 回日本臨床微生物学会総会において「会長講演」を行った内容に加筆修正し、抗菌薬の開発当時から今日に至るまで、我が国で臨床問題となった、あるいは問題となりつつある呼吸器感染症原因細菌における耐性化の本質について述べた。MRSA に始まり、市中感染症の主要な原因菌における耐性菌、すなわち PRSP, BLNAR, そしてマクロライド系薬耐性肺炎マイコプラズマ等である。40 年近くにわたる著者らの耐性菌に関する一連の研究を振り返るとき、発症時に原因微生物を短時間で推定・確定し、適切な治療抗菌薬を絞り込むことなしには、耐性菌の問題は解決しないと考えるに至っている。著者らの研究室ではそのようなコンセプトに基づき、細菌とウイルスを対象とした迅速診断法を開発してきたが、その成績についても具体的に述べた。

Key words: antimicrobial resistance, respiratory tract infection, community-acquired infection

1. はじめに

2008 年 1 月 26 日と 27 日の 2 日間にわたり、第 19 回日本臨床微生物学会総会（タワーホール船堀，東京）が開催された。その中で「臨床微生物検査の将来に向かって—ウイルスから細菌まで—」と題する会長講演を行ったが、その概略を「総説」として書きとめておきたいと考えた。講演の前半に相当する部分は、著者の恩師である紺野昌俊帝京大学名誉教授が「抗菌薬の開発と薬剤耐性菌の歴史」として、本誌に詳細な総説をすでに書かれている¹⁾。その内容は、第 1 回「薬剤耐性菌研究会（2003 年 11 月 14 日，伊香保）での特別講演が土台となっているが、抗菌薬開発以前の感染症に始まり、初期の抗菌薬開発と多剤耐性黄色ブドウ球菌の実態、その後のグラム陰性桿菌の耐性化、そして MRSA の出現の背景と多岐にわたっている。その時々で繁用された抗菌薬の種類と、その結果として必然的に出現した耐性菌について、臨床医の視点から

詳細に述べられている。

そのようなことから、この総説においてはできるだけ重複を避け、著者が行ってきた研究の中から、検査業務にかかわる方々に知っていただきたい呼吸器感染症原因菌における耐性化の本質と、検査のあるべき将来像を中心に述べたことをお断りしておく。

2. 1970 年代の感染症

著者の研究は、大学卒業後の 1968 年に東京大学医学部附属病院分院・小児科の細菌研究室に研究員として勤務したことから始まる。紺野の総説¹⁾に見られるように、その当時、小児の間には黄色ブドウ球菌による膿胸などの重症の化膿疾患が多く見られていた時代である。菌に紫外線を照射すると染色体上の溶原化ファージが増殖を開始し、ファージによって染色体外のプラスミド上に存在するペニシリン (PC), マクロライド (ML), テトラサイクリン (TC), クロラムフェニコール (CP) などの薬剤耐性遺伝子が感性菌へ伝達でき、それに伴って菌の病原性も変化することを明らかにするのが主な研究であった²⁾。研究にはその当時性能が急速に進歩した電子顕微鏡が用いられ、菌やファージの形態も観察している。

ほどなく、著者らは帝京大学医学部へ移り、以後 15 年ほどの間、小児科領域で問題となるさまざまな細

著者連絡先: (〒108-8641) 東京都港区白金 5-9-1
北里大学北里生命科学研究所 病原微生物
分子疫学研究室
生方公子
TEL: 03-5791-6385
FAX: 03-5791-6386
E-mail: ubukatak@lisci.kitasato-u.ac.jp

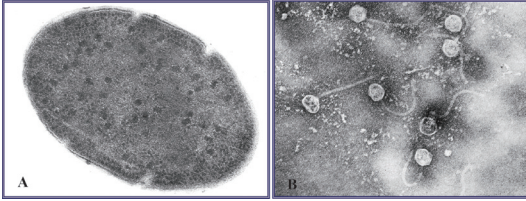


図1. A群溶血性レンサ球菌に紫外線照射をした後に誘発されたファージ

1975年頃小児の間に流行した T12 型 (*emm12* 型) 菌の macrolide 系薬, tetracycline, chloramphenicol 耐性はこのようなファージによって伝達された。

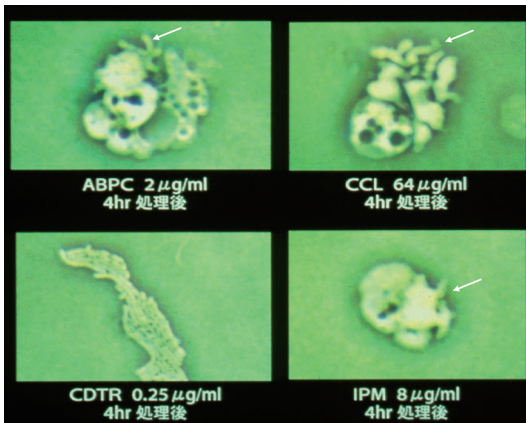


図2. インフルエンザ菌にβ-ラクタム系薬を作用させ、薬剤を除去した後の再増殖スフェロプラストやフィラメント化した菌であっても、溶菌せずに残った細胞からは元の桿菌へと戻ることができる。16 mm 微速度撮影によって観察された一部。

菌、すなわち A 群溶血性レンサ球菌 (GAS), 肺炎球菌, 黄色ブドウ球菌, インフルエンザ菌, 緑膿菌などの研究を行ったが, それ以外に肺炎マイコプラズマ (マイコプラズマ), 百日咳菌, リステリア菌など, 一見脈絡がないように見える細菌の分離を経験したことが, その後の研究の土台になっている。

図1はその一例であるが, GAS における ML 耐性伝達の研究を行っていた当時のファージの電子顕微鏡写真である。当時は T-12 型 (現在では *emm12* 型に相当) の GAS が小児で流行しており, ML, TC, および CP に高度耐性であったが, これらの耐性はプラスミド上に存在しており, ファージに取り込まれて感性菌へと伝達させることができた³⁾。

インフルエンザ菌については, 1978 年に難治性的小児膿胸例を経験したことから, 治療抗菌薬として何

が適切であるのかを基礎的に明らかにする研究を行っている^{4),5)}。当時, インフルエンザ菌では TEM 型 β-lactamase 産生のみが治療上の問題となっていたが, 当該遺伝子は比較的大きいプラスミド上に存在していることを電子顕微鏡下に観察し, その耐性伝達を報告した⁶⁾。しかし, インフルエンザ菌の治療上での本質的な問題は, 感性菌に β-ラクタム系薬を作用させても短時間では容易に溶菌しないこと, そして溶菌しないままに薬剤が消失すると, 図2に示したように薬剤によって変形した球状のスフェロプラストから元の桿菌へと再び戻りうることを, 16 mm による微速度撮影によって明らかにしたことである⁷⁾。つまり, 本菌はその特性から遺伝子変異を有する菌がひとたび出現すると選択されやすく, また, それらは生体内に残存しやすいのである。一見, 本菌に対する MIC が優れている薬剤を臨床の現場で使用しても, 再発・再燃しやすいこと, また, 今日問題となっている BLNAR が出現したのは正しくこのためである。

3. 1980 年代の MRSA 感染症

黄色ブドウ球菌はヒトにおいては最もポピュラーな菌で, 健康人の多くが鼻腔中に保菌している。それゆえ, 平素無菌的な検査材料から分離されない限り, 臨床的な意義は検査室では判然としないことが多く, 報告書には慎重なコメントが要求される。

このことを菌の側から見ると, 常在化しやすい菌は, 知らない間に多くの抗菌薬にさらされていることを意味している。黄色ブドウ球菌のように耐性化しやすい菌と, レンサ球菌のように耐性化しにくい菌とがあるものの, 呼吸器感染症の原因菌となる多くの細菌が次々に耐性化してきている背景には, このように「菌が死滅しない程度の微量濃度の薬剤にさらされる環境下に棲息する」ことが大きな理由である。

その始まりが MRSA である。我が国においては 1980 年代前半から MRSA が問題化してきたが, 著者ら⁸⁾による *mecA* 遺伝子発見のきっかけになったのは, 図3に示すように当時開発が盛んであった第三世代セフェム薬による誘導現象, すなわち薬剤濃度の濃い部分で菌の発育が見られ, 薄い濃度域でその発育が阻止される二重リング現象である。

若い検査技師の方々には目にしたことがないかもしれないが, 著者はこの現象を目にした時, すでに知られていたブドウ球菌の ML 耐性の誘導に非常に似ていると感じ, 何かのタンパク質 (酵素) の産生が高まっているのであろうと推定した。その本体が *mecA* 遺伝子にコードされた PBP2' の誘導産生であった⁹⁾。当時

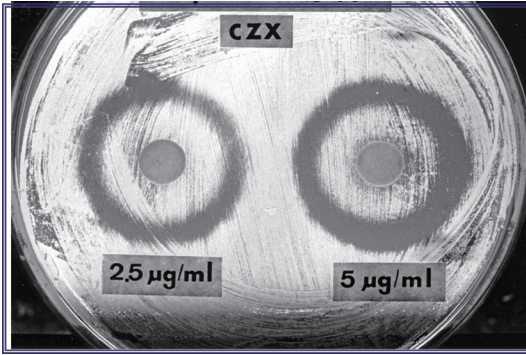


図3. MRSAが問題化した1980年代初期に観察された誘導型MRSAの二重リング現象
薬剤の濃い濃度域で菌が発育し、薄い濃度域で菌の発育が阻止されている。

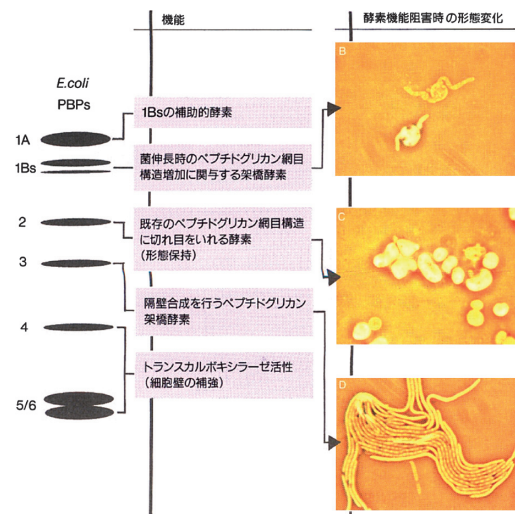


図4. β-ラクタム系薬の作用標的である大腸菌の細胞壁合成酵素と阻害時の形態変化

は、研究時間だけは十分に確保できた時代で、もし多忙であったなら、今とは比べものにならないほど煩雑であった遺伝子操作での *mecA* 遺伝子のクローニング^{10), 11)}には成功していなかったであろうと思う。

MRSAの研究は、抗菌薬を選択する指標であるMICについても多くのことを考えさせられた。1970年代の後半から日本の製薬企業においては第二、第三代セフェム系薬が盛んに開発されたが、それらは第一世代セフェム系薬に比較すると、グラム陰性桿菌(GNB)に対するMICは優れているものの、その主たる作用標的は隔壁合成酵素のPBP3であり、溶菌に結びつくPBP1Aや1Bではなかったことである(図4)。つまり、菌はMICよりも濃い薬剤濃度であって

も、伸長化(フィラメント化)した後に細胞壁の脆弱部位からようやく溶菌に至る¹²⁾。また、このような薬剤は、グラム陽性球菌(GPC)に対する抗菌力、特に殺菌力はGNBに対する作用と反比例していずれも劣っていた。

4. PRSP

上述したMRSAは、日本において院内感染菌としてさまざまな問題を提起したが、残念ながら抗菌薬について見ると注射用セフェム系薬の問題としてのみとらえられ、将来同様のことが市中感染症に用いられる経口セフェム系薬においても起りうるかもしれないという考えには及ばなかった。熟考すれば、経口セフェム系薬の吸収性はペニシリン系薬に比してはるかに劣っており、また、前述したように殺菌性も劣っていたことは耐性菌を生じさせる下地が十分にあったのである。

1988年、著者ら¹³⁾は本邦におけるPRSPによる化膿性髄膜炎の第一例目を経験した。日本では抗菌薬のなかった時代の肺炎球菌感染症の脅威はすっかり忘れ去られ、どのようなβ-ラクタム系薬を投与しても簡単に治癒せしめるものとの意見が大勢を占めていた。

ちょうどその頃、ペニシリン系薬が優位に使用されていた欧米において、PRSPが臨床上的大きな問題となっていることに関するいくつかの総説^{14), 15)}が目にとまった。欧米では肺炎球菌について莢膜型も含めた大規模なサーベイランスが行われていること、その中に日本の正確な疫学データが見られないことを思い知らされた。ちなみに、欧米ではこのような大規模サーベイランスは予防用ワクチンタイプを決定する基礎データとなっている。我が国では、大規模サーベイランスが重要であるという認識が全体的に極めて乏しく、何かことが起こったときに慌てて対処し、結局費用がかかる特異な国民性をもっている。予防に重点を置く欧米とは根本的に考え方が異なるようで、憂うべきことである。私どもが声を大にしてサーベイランスの必要性を訴えていくしかないのである。

さて、世界に通用するような欧米に劣らない精度の高い肺炎球菌の疫学研究のためには、菌株を集中して解析するのが良いと考えた。1993年に組織された全国規模の「PRSP研究会」はそのような背景から生まれ、多くの検査技師の方々の協力によって成り立った「問題解決型研究会」である。3年間の成果は単行本としてまとめられた¹⁶⁾。

期間中に収集された4,255株のペニシリン感受性分布は、図5に見られるように、緩やかな2峰性分布

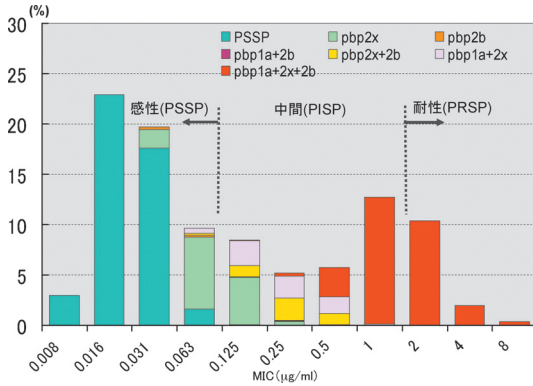


図5. 「PRSP研究会」によって収集された肺炎球菌の penicillin G 感受性 ($n=4,255$) β -ラクタマーゼ産生菌のように、感性和耐性が明瞭に区別されないのが特徴である。

を示し、生物学的手法では感性和耐性が明瞭に区別できないのであった¹⁷⁾。このような感受性分布に対し、 $2 \mu\text{g/ml}$ 以上を耐性 (PRSP)、 $0.063 \mu\text{g/ml}$ 以下を感性和 (PSSP) とするように NCCLS (現 CLSI) によって当時報告されていたが、 β -ラクタマーゼ産生菌に対するブレイクポイントのように明確には区別しえなかった。つまり、測定時に試験管 1 管ずれると、PISP が PSSP に判定されてしまうのである。

著者らが耐性遺伝子解析から合理的識別方法として PCR による変異の有無を検索し、genotype (g) による表記をすることを考えたのは、この曖昧な分布の詳細を明確にしたかったことによる¹⁸⁾。なお、この PCR 検査は欧米の菌に対しても十分応用可能であることが証明されている¹⁹⁾。

さて、肺炎球菌には β -ラクタム系薬の作用標的となる細胞壁合成酵素 (PBP) は 6 種認められるが、薬剤作用と PBP 親和性、形態との関係を見ると、PBP1A は壁を長軸方向へ伸長させる酵素、PBP2X、2A は隔壁合成酵素、そして 2B は本菌特有のランセット形の形成にかかわっていると推定される²⁰⁾。

カルバペネム系薬やペニシリン系薬は PBP1A、2B に強く結合性して優れた殺菌性を示し、セフェム系薬は 2X や 2A に強く結合性して作用するため、殺菌性はペニシリンに比して劣る。肺炎球菌の β -ラクタム系薬耐性化においては PBP1A、PBP2X、PBP2B をコードする三つの遺伝子における変異が耐性化のうえで重要である。

肺炎球菌におけるそれら 3 遺伝子を解析すると、多数のアミノ酸置換が認められるが、耐性肺炎球菌に見いだされるこのような PBP 遺伝子は、口腔内レンサ

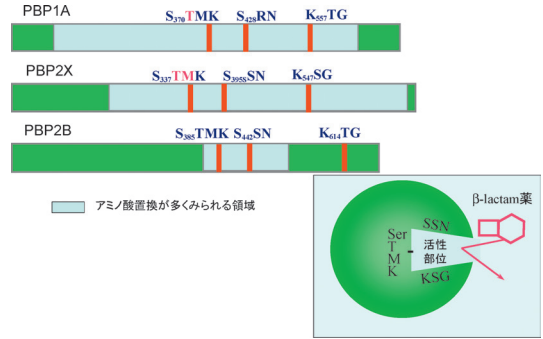


図6. 耐性肺炎球菌に認められる細胞壁合成酵素の PBP1A、PBP2X、および PBP2B をコードする各遺伝子 (模式図) 赤のバーは β -ラクタム系薬が結合するのに重要な保存性アミノ酸配列の位置を示す。酵素では右下に示すように、これらの保存性アミノ酸配列は活性ポケットを形成している。 β -ラクタム系薬はこの活性ポケットに入り込み、セリン (Ser) に結合して PBP の活性を阻害する。

球菌の PBP と組み替えを生じて形成されたハイブリッド遺伝子で、後述するインフルエンザ菌のように遺伝子変異ではないことを特徴としている。

しかし、多数のアミノ酸置換の中でも耐性化に強く影響するのは特定の部位におけるアミノ置換である。図6にそれぞれの PBP を模式的に示すが、セリン (Ser) を含む活性部位が重要で、この周囲に位置するアミノ酸が他のアミノ酸に置換すると、PBP の立体構造にゆがみが生じ、薬剤がセリンに結合できなくなって耐性化する。つまり PCR では PBP 遺伝子全体を調べる必要はなく、耐性化に決定的に影響する変異の有無さえ検索すれば良いことになる。

先のペニシリン感受性分布に PCR による遺伝子データを重ね合わせ、遺伝子別に MIC の分布を見ると、90% 近い株が試験管 3 管以内におさまっている。このように、耐性化にいくつかの遺伝子が関与している場合には、遺伝子を正確に調べない限り MIC が真に意味するところは明らかにできない²¹⁾。そして、欧米の分離株と我が国の分離株で大きく異なる点は、ペニシリンが優位に処方されている欧米では少ない PBP2X 変異株、つまり、セフェム系薬の感受性低下に影響する変異株が日本では多いということである²²⁾。

一方、ML 系薬耐性化には二つのメカニズムが知られている。一つは、以前からよく知られているリボソームをジメチル化する酵素で、*erm(B)* 遺伝子に支配

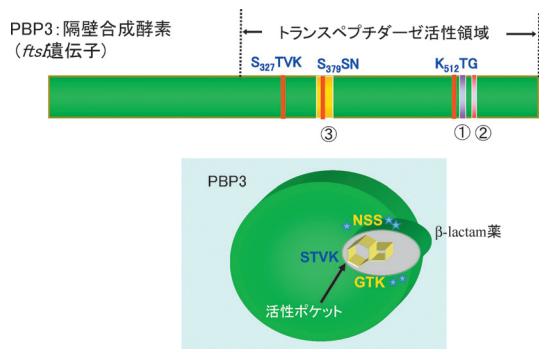


図7. BLNARの隔壁合成酵素PBP3をコードする遺伝子上の変異
軽度耐性のBLNAR(Low-BLNAR)では、①あるいは②のいずれかのアミノ酸置換のみであるが、BLNARでは①と③、または②と③の双方にアミノ酸置換が見られる。

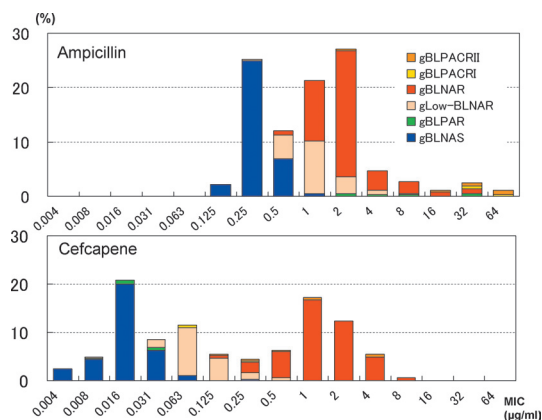


図8. 小児肺炎例由来のインフルエンザ菌のampicillinとcefcapeine感受性
2006年の分離株(n = 365)。赤で示すBLNARの感受性低下がセフェム系薬のほうで大きい。つまりPBP3に対する薬剤の親和性の低下によるものである。

され、この耐性遺伝子を保持すると既存のML系薬すべてに高度耐性化する。もう一つは、菌体内へ取り込まれた薬物を排出する膜タンパク質で、菌がこのタンパク質をコードするmef(A)遺伝子を保持すると、EM, CAM, AZMには1~8 µg/mlと軽度耐性化する。日本では現在、これらのML耐性遺伝子を保持しない感性菌は20%程度にしか過ぎない。

「PRSP研究会」の疫学研究が果たした業績の中で、今後最も大きく貢献するであろうことは、病原性にかかわる莢膜型を調べたことである¹⁶⁾。ちなみに、当時

の成績と本学会において行われた肺炎球菌のアナライザワークショップ(AWS)の成績とを比較すると、成人由来株の莢膜型が大きく変化してきていることに気づかされる。今後、莢膜型がどのように変遷していくのか、“大規模な分子疫学研究”を定期的実施していくことが望まれよう。

なお、補足しておく、成人に対してキノロン系薬が多く使用されてきた欧米において、肺炎球菌のキノロン耐性化が数年前から問題になってきている²³⁾。我が国では、現在その耐性率は数%と低い²⁴⁾が、レスピラトリーキノロン薬の登場に伴い、その耐性化動向には十分な監視が必要と考える。

5. BLNAR

インフルエンザ菌は、肺炎球菌とともに呼吸器系検査材料の喀痰や咽頭ぬぐい液からポピュラーに分離される菌で、分離されたからといって直ちに原因菌とは判断できない菌でもある。何らかの対応が必要なのは、分離菌の5~10%を占めるb型の莢膜(Hib)、あるいはその他の莢膜を有するインフルエンザ菌が分離された場合である。分離菌の大半を占める莢膜を有しない型別不能のインフルエンザ菌(NT株)では、無菌的な検査材料から分離された場合には意味を有しているが、常在菌の混じる検査材料をもとに起炎菌と確定するには、炎症所見や貪食像の確認を要する。

インフルエンザ菌に対するセフェム系薬の作用は、一見MICが優れているように見えても溶菌に時間を要することは、遺伝子変異が生じた細胞を選択しやすいことを先述した。近年、薬剤の生体内濃度の推移と耐性菌選択との関係について、mutant selection window(MSW)やmutant prevention concentration(MPC)が盛んにいわれるが、それはこのようなことを指している。インフルエンザ菌では日常業務の薬剤感受性検査で接種菌量が多いと、ウェルの底に沈殿物が見えやすいが、それらはフィラメント化した菌やスフェロプラスト化した細胞の残骸、あるいは溶菌前の変形細胞が沈殿したものである。

6. マクロライド耐性マイコプラズマ

次に非定型肺炎の主要な原因菌であるマイコプラズマのML耐性化について記したい。本菌は呼吸器感染症の重要な原因菌でありながら、分離培養は診断に役立たないためか、日本のみならず世界的にもほとんど実施されなくなった。しかし、MLの広範な使用は、いつか必ず耐性マイコプラズマを選択するであろうと予測されていた。ML耐性のマイコプラズマは岡崎

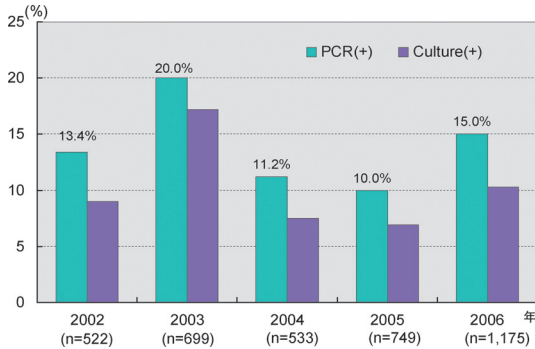


図9. 小児肺炎例におけるマイコプラズマ感染症 PCRによる陽性率と PCR 陽性検体に実施された培養での陽性率。総検体数 3,678 検体について実施されているが、流行年はあるものの、10~20%がマイコプラズマ肺炎であることが示されている。抗菌薬の適正使用を考えると、マイコプラズマの迅速検査は必須である。

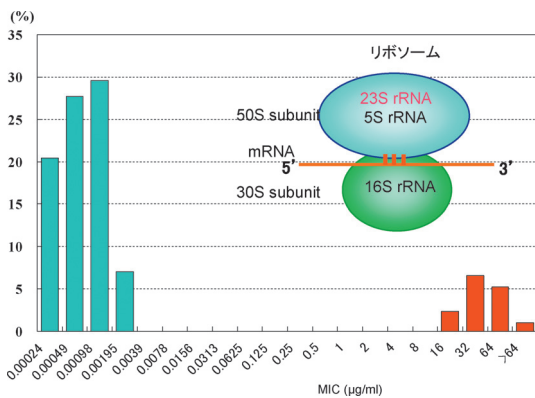


図10. マイコプラズマの azithromycin 感受性 (n=380) erythromycin, clarithromycin, telithromycin などにも同様の感受性パターンを示す。23S rRNA 上のたった一つの変異で高度耐性化する。

ら³⁰⁾によって初めて報告されたが、同時期に、当研究室の諸角は大学院修士課程の研究において本菌に対する PCR 法を構築し、図9に見られるように極めて効率的にその分離培養を行うことに成功した^{31)~33)}。小児肺炎例の10~20%が PCR でマイコプラズマ陽性であり、そのうちの約75%前後から菌そのものを分離している。ペアー血清で測定された抗体価でも数例を除いてその有意な上昇が確認されている³²⁾ので、本菌の分離には PCR を実施して検査材料を選り分けることが効率的である。

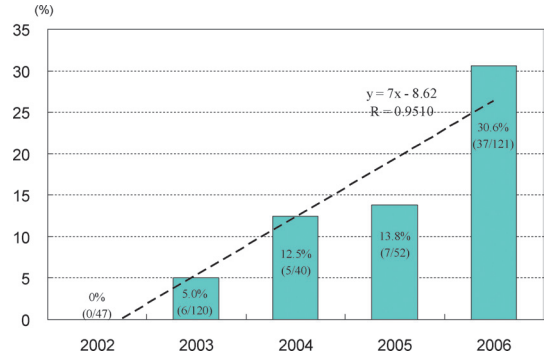


図11. 小児肺炎例から分離されたマイコプラズマに占める macrolide 系薬耐性マイコプラズマの経年的推移
マイコプラズマには2種のタイプがあるが、そのいずれにも耐性菌が出現している。

図10には2006年までに分離した380株のマイコプラズマに対する AZM の感受性成績を示す。EM, CAM, TEL, JM などの感受性もほぼ同様の成績となっている。本来、MLはマイコプラズマに対して非常に優れた抗菌活性を有しているが、耐性菌の MIC は経口 ML の投与では臨床的に無効なレベルに達している。この耐性化は、リボソームの23S rRNA 上のドメイン V のアデニン 2063 のグアニンへの置換、あるいはアデニン 2064 のグアニンへのいずれかの置換によるリボソームの質的变化に起因する³⁴⁾。

図11には、小児肺炎例において、マイコプラズマの分離を開始した2002年からの耐性菌の年次推移を示したが、ML耐性菌が急速に増加してきていることが示されている³⁵⁾。小児の外来診療において、非定型肺炎と診断された学童に対し、MLを投与しても症状が遷延化し、抗菌薬をMINOなどに変更せざるをえない例が増加してきているのである。ちなみに、最近、成人例からも ML 耐性マイコプラズマが分離されるようになり、この種の耐性菌の増加が憂慮される。

7. 耐性化の本質

今まで記した MRSA, PRSP, BLNAR, そして ML 耐性マイコプラズマ等の市中呼吸器感染症の主要細菌にみられる薬剤耐性化は、次のように要約される。すなわち、(i) その耐性化の本質は、菌の生存にとって必須の構成物である PBP, リボソーム, DNA 合成酵素等の質的变化によって生じている。(ii) 菌は生存に差し支えない程度にそれらの構成物を巧みに変化させ、抗菌薬に耐性化している。(iii) それゆえ、「耐性化」の

初期にはそのレベルが低く、生物学的手法では正確には識別しがたいのである³⁶⁾。

呼吸器感染症の原因菌において、なぜこのような耐性化が次々と生じてくるのであろうか？ その原因の一つは、市中で汎用される経口抗菌薬、すなわち、 β -ラクタム系薬、ML系薬、およびキノロン系薬の我が国における常用投与量では、病巣内移行濃度が耐性菌に有効な域に達していないためである。

耐性菌の増加防止には、「抗菌薬の適正使用」も必要であることは論を待たないが、それは容易ではないことも事実である。このため、小児科、耳鼻咽喉科、内科、あるいは化膿性髄膜炎等に対するガイドラインが公表されている。抗菌薬の使用に関する基本的概念を提示し、その使用について一定のコンセンサスを得ることは意義深いことである。

しかし、個々の症例に対しきめ細かく対応するには、抗菌薬投与前に細菌とウイルスを含めた起炎微生物を迅速に、しかも正確に検索することが本来あるべき姿であろう。

8. Real-time PCR による原因微生物の網羅的検索

前述したコンセプトに基づき、著者らは5年近い歳月をかけて細菌とウイルスに対する網羅的迅速検索法を構築し、その精度の検証を行ってきた³⁷⁾。その real-time PCR 法によるプロトコールを図12に示す。これらは、上咽頭ぬぐい液、鼓膜穿刺液、喀痰、胸水、閉鎖性膿汁、髄液などの検査材料に用いることが可能である。検索菌種は、(i)肺炎球菌、(ii)インフルエンザ菌、(iii)マイコプラズマ、(iv)GASを含む β 溶血性レンサ球菌、(v) *Chlamydia pneumoniae* (クラミドフィラ)、(vi) *Legionella pneumophila* (レジオネラ)

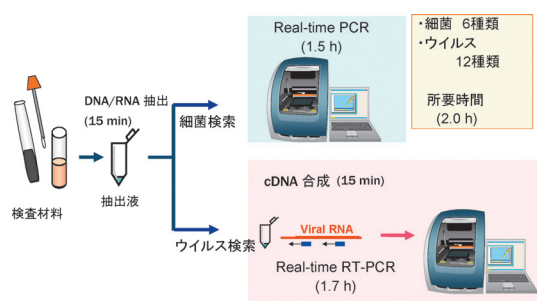


図12. 呼吸器系感染症における主要細菌とウイルスに対する real-time PCR による網羅的検索方法
検査材料受領から約2時間以内に結果が判明する。DNA/RNAの抽出にはキットを使用。

である。検索用遺伝子は、肺炎球菌が *lytA* 遺伝子、レジオネラが *mip* 遺伝子、そしてインフルエンザ菌、マイコプラズマ、クラミドフィラ、GASは16S rRNA遺伝子である³⁸⁾。

本法では反応チューブあたりいずれの菌に対しても10コピー以下の高い検出感度と、蛍光色素を付けたモレキュラービーコンプローブ、あるいはサイクリックプローブを用いて高い特異度が保たれている。また、2時間以内に結果が得られ、定量性(菌数の推定)があること、省力化できていること、パソコンからのデータ送信も将来可能である。

一方、検索対象とした呼吸器系ウイルスは12種類である。すなわち、アデノウイルス(AdV)、インフルエンザA、B(Flu)、RSV、パラインフルエンザ(PIV)1、2、3、ライノ(RV)、エンテロ(EV)、コロナ(CoV)の各ウイルス、そして最近発見されたヒューマンメタニューモウイルス(hMPV)、ヒューマンボカウイルス(HBoV)である。ウイルスの場合、AdVとHBoVを除いてRNAウイルスのため、まずRNAからcDNA合成を行わなければならないが、かつては数時間要したこのステップが、新たな合成酵素によって15分と短縮できている。

図13には中山³⁹⁾の小児肺炎例に対する細菌とウイルスの網羅的検索成績を示すが、ウイルスが原因であった例が相当な割合を占めていることが示されている。細菌のみを検索し、結果が陰性であった場合、入院当日にウイルスの結果が明らかになるメリットは大

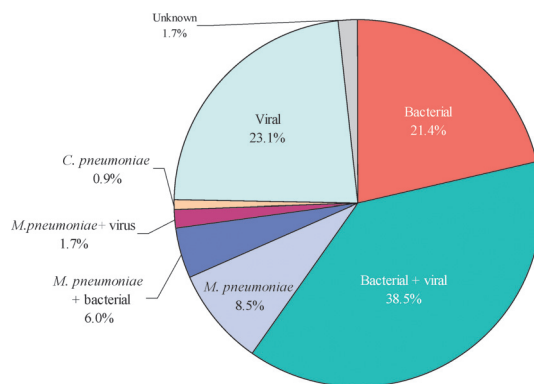


図13. 小児肺炎例に対して実施された real-time PCR 法による細菌とウイルスの検索
いくつかのウイルスについては抗体価も測定しているが、明らかにPCR陽性であれば抗体価は上昇している。上咽頭ぬぐい液や喀痰でウイルス陽性の場合、ほぼ起炎微生物と推定して差し支えない。

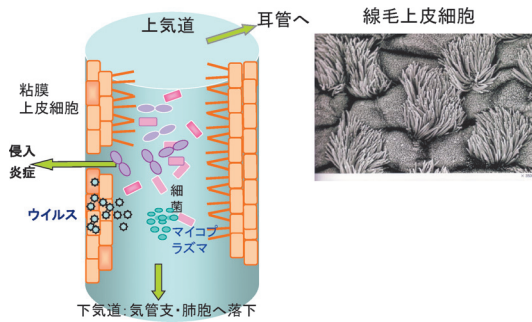


図 14. 呼吸器感染症の成立 (模式図)

きいであろう。また、細菌の陽性例においても、菌種が推定できれば、耐性菌の頻度からみてより有効な抗菌薬を選択しうるはずである。

9. ま と め

呼吸器感染症の原因となりうる細菌の多くは、図 14 に示すように、線毛上皮細胞が正常に機能していれば、上気道へ侵入しても異物排出システム（エスカレータークリアランス）によって排出され、発症に至ることは少ないといわれる。事実、保育園児などの保菌調査を実施すると、多くの児から肺炎球菌やインフルエンザ菌、あるいは黄色ブドウ球菌が濃厚に分離される。

呼吸器系ウイルスが侵入し、粘膜上皮細胞が侵入ウイルスによってダメージを受けると、常在化していた細菌は容易に増殖し、耳管へ侵入、あるいは下部気道へと落下し、細菌による二次感染症を成立させる。ただし、菌が常在化する一面を有していることは、ヒトにとってはこれらの微生物に曝露され、刺激を受けることによって抗体を獲得していく一つの過程であることも忘れてはならない。

最後に、感染症をグローバルな視点で眺めると、ヒトを取り巻く社会構造の変化とともにそれは変貌していることがとらえることができる。すなわち、それぞれの国特有の年齢構成、医療レベル、ワクチン接種状況、そして交通網の発達や地球環境の変化など、常にその影響を受けているのである。

目まぐるしく変貌する感染症に対しては、“効率的な微生物の迅速検索システムの構築”と、“全国規模での精度の高い持続的疫学解析”が必要であることを強調しておきたい。

謝 辞 会長講演のうち、2001 年以降の一連の研究は、北里大学においてなされたものである。村山琮

明講師、当時大学院生であった長谷川恵子博士と諸角美由紀博士、および千葉菜穂子、砂押克彦、高田恵未、井上永子、油橋宏美、輪島文明、関 千鶴子の各大学院生、そして研究員の中山栄一博士、小野暁子氏に心より感謝申し上げる。また、いくつか関連する研究班に参加され、ご協力いただいている臨床医の先生方にも感謝申し上げます。

文 献

- 1) 紺野昌俊. 2004. 抗菌薬の開発と薬剤耐性菌の歴史. 日本臨床微生物学雑誌 14: 1-23.
- 2) 生方公子, 紺野昌俊, 沢井稔, 他. 1977. 最近の重症ブドウ球菌感染症に対する疫学研究. 第 2 編 分離したブドウ球菌のファージ型およびプロファージ型について. 小児科臨床 30: 1513-1520.
- 3) Ubukata, K., M. Konno, R. Fujii. 1975. Transduction of drug resistance to tetracycline, chloramphenicol, macrolides, lincomycin, and clindamycin with phages induced from *Streptococcus pyogenes*. J. Antibiotics 28: 681-688.
- 4) 齋藤洪太, 柳瀬義男, 生方公子, 他. 1978. *Haemophilus influenzae* 感染症治療におけるペニシリン系抗生物質の意義について 第 1 編. Chemotherapy 26: 499-507.
- 5) 柳瀬義男, 生方公子, 高橋洋子, 他. 1978. 同上 第 2 編. Chemotherapy 26: 508-516.
- 6) 生方公子, 高橋洋子, 紺野昌俊. 1978. 本邦で分離された ampicillin 耐性 *Haemophilus influenzae* の性状について. Chemotherapy 26: 491-498.
- 7) 生方公子, 高橋洋子, 紺野昌俊. 1978. *Haemophilus influenzae* 感染症治療におけるペニシリン系抗生物質の意義について 第 4 編. Chemotherapy 26: 508-516.
- 8) 紺野昌俊 (編). 1991. MRSA 感染症のすべて. 医薬ジャーナル社. 大阪.
- 9) Ubukata, K., N. Yamashita, M. Konno. 1985. Occurrence of a β -lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 27: 831-857.
- 10) Matsushashi, M., M. D. Song, F. Ishino, et al. 1986. Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to β -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 167: 975-980.
- 11) Ubukata, K., R. Nonoguchi, M. Matsushashi, et al. 1989. Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. J. Bacteriol. 171: 2882-2885.

- 12) 紺野昌俊, 旭 泰子, 生方公子. 1999. 大腸菌のペニシリン結合蛋白に対する β -ラクタム系薬の親和性, MIC, 殺菌効果ならびに形態変化におよぼす影響について. 日治療誌 47: 271-286.
- 13) 有益 修, 他. 1988. β -ラクタム剤が無効であった肺炎球菌性髄膜炎の1例. 感染症誌 62:682-683.
- 14) Appelbaum, P. C. 1977. *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. Lancet ii: 995-997.
- 15) Klugman, K. P., H. J. Koornhof. 1988. Drug resistance patterns and serogroups or serotypes of pneumococcal isolates from cerebrospinal fluid or blood, 1979-1986. J. Infect. Dis. 158: 956-963.
- 16) 紺野昌俊, 生方公子 (編). 1999. 改定ペニシリン耐性肺炎球菌. (株)協和企画通信. 東京.
- 17) Ubukata, K., Y. Asahi, K. Okuzumi, et al. 1997. Incidence of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Japan, 1993-1995. J. Infect. Chemother. 2: 77-84.
- 18) Ubukata, K., T. Muraki, A. Igarashi, et al. 1997. Identification of penicillin and other β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* by PCR. J. Infect. Chemother. 3: 190-197.
- 19) Nagai, K., Y. Shibasaki, K. Yamamoto, et al. 2001. Evaluations of the primers for PCR to screen *Streptococcus pneumoniae* isolates, β -lactam resistance and to detect common macrolide resistance determinants. J. Antimicrob. Chemother. 48: 915-918.
- 20) Kobayashi, R., M. Konomi, K. Hasegawa, et al. 2005. *In vitro* activity of tebipenem, a new oral carbapenem antibiotic, against penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 49: 889-894.
- 21) Chiba, N., R. Kobayashi, K. Hasegawa, et al. 2005. Antibiotic susceptibility according to genotype of penicillin-binding protein and macrolide resistance genes and serotype of *Streptococcus pneumoniae* isolates from community-acquired pneumonia in children. J. Antimicrob. Chemother. 56: 756-760.
- 22) Ubukata, K. 2003. Problems associated with high prevalence of multidrug-resistant bacteria in patients with community-acquired infections. J. Infect. Chemother. 9: 285-291.
- 23) 田中真由美, 他. 2005. キノロン薬耐性. 化学療法の領域 21: 1283-1290.
- 24) Yokota, S., K. Sato, S. Yoshida, N. Fujii. 2004. Molecular epidemiology of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Japan. 感染症誌 78: 428-434.
- 25) Ubukata, K., Y. Shibasaki, K. Yamamoto, et al. 2001. Association of amino acid substitution in penicillin-binding protein 3 with β -lactam resistance in β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 1693-1699.
- 26) Hasegawa, K., et al. 2003. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. Microbial Drug Resistance 9: 39-46.
- 27) Hasegawa, K., N. Chiba, R. Kobayashi, et al. 2004. Rapidly increasing prevalence of β -lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in meningitis. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 1509-1514.
- 28) 長谷川恵子, 千葉菜穂子, 小林玲子, 他. 2004. 化膿性髄膜炎例から分離された *Haemophilus influenzae* の疫学解析 —1999年から2003年の分離株について—. 感染症誌 78: 835-845.
- 29) Hasegawa, K., R. Kobayashi, E. Nakayama, et al. 2006. High prevalence of type b β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in meningitis: the situation in Japan where Hib vaccine has not been introduced. J. Antimicrob. Chemother. 57: 1077-1082.
- 30) 岩田 敏. 2008. 肺炎球菌およびインフルエンザ菌感染症に対するワクチン接種の意義と今後の展望. 日本臨床微生物学雑誌 18: 1-7.
- 30) Okazaki, N., M. Narita, S. Yamada, et al. 2001. Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin *in vitro*. Microbiol. Immunol. 45: 617-620.
- 31) Morozumi, M., K. Hasegawa, N. Chiba, et al. 2004. Application of PCR for *Mycoplasma pneumoniae* detection in children with community-acquired pneumonia. J. Infect. Chemother. 10: 274-279.
- 32) Morozumi, M., A. Ito, S. Y. Murayama, et al. 2005. Assessment of real-time PCR for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in pediatric patients. Can. J. Microbiol. 52: 125-129.
- 33) 諸角美由紀, 生方公子. 2005. リアルタイムPCRを用いたマイコプラズマの検出. 化学療法の領域 21: 51-56.
- 34) Morozumi, M., K. Hasegawa, R. Kobayashi, et al. 2005. Emergence of macrolides-resistant *Mycoplasma pneumoniae* with a 23S rRNA gene mutation. Antimicrob. Agents Chemother. 49: 2302-2306.

- 35) Morozumi, M., S. Iwata, K. Hasegawa, et al. 2008. Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in pediatric patients with community-acquired pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 348–350.
- 36) 生方公子. 2006. 呼吸器感染症原因微生物の質的变化による薬剤耐性化. *日治療誌.* 54: 69–94.
- 37) 諸角美由紀, 青木泰子, 生方公子. 2006. 呼吸器感染症の起因菌迅速同時検出法. *臨床病理レビュー特集号* 134: 151–156.
- 38) Morozumi, M., E. Nakayama, S. Iwata, et al. 2006. Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes. *J. Clin. Microbiol.* 44: 1440–1446.
- 39) Nakayama, E., K. Hasegawa, M. Morozumi, et al. 2007. Rapid optimization of antimicrobial chemotherapy given to pediatric patients with community-acquired pneumonia using PCR techniques with serology and standard culture. *J. Infect. Chemother.* 13: 305–313.

Fundamentals of Rapidly-progressing Antimicrobial Resistance in Bacterial Pathogens Causing Community-acquired Respiratory Tract Infections

Kimiko Ubukata

Laboratory of Molecular Epidemiology for Infectious Agents,
Graduate School of Infection Control Sciences & Kitasato Institute
for Life Sciences, Kitasato University

This is a substantial revision of the content of the “Chairperson’s Lecture” at the 19th Japanese Society for Clinical Microbiology and states the fundamentals of antimicrobial resistance of bacterial pathogens causing respiratory tract infections which has become or is becoming clinical problems in Japan. Going back to a series of researches which the author has been involved in over 40 years, it is emphasized that precise and quick identification of causative microorganisms in onset of diseases is most required at present in bacteriological examinations. Which technique our laboratory is using to try to measure such situation is also described in detail.

In microbiological examinations, it is important to identify causative microorganisms quickly and report it to the side of clinical practice for selection of the most appropriate antibacterial drugs based upon the results. The author also states that this is the effective method not only for treatment but also for preventing development of resistant bacteria.