

[原 著]

マクロライド系抗菌薬に高度耐性を示した臨床材料由来
Moraxella catarrhalis の解析

山田景土¹⁾・柏真知子¹⁾・風間晴子²⁾・齋藤良一³⁾

¹⁾ 公益財団法人東京都保健医療公社豊島病院検査科

²⁾ 東京都立墨東病院検査科

³⁾ 東京医科歯科大学大学院保険衛生学研究科生体防御検査学分野

(平成 24 年 8 月 27 日受付, 平成 25 年 4 月 18 日受理)

Moraxella catarrhalis は, 呼吸器感染症の原因菌のひとつとして臨床材料から高頻度に分離される。今回, 我々は臨床材料より分離されたマクロライド系抗菌薬 (MLs) に高度耐性を示した *M. catarrhalis* 耐性因子について解析を行ったので報告する。Disk 拡散法による薬剤感受性検査では, clarithromycin (CAM) における阻止円は認められず, E-test を用いて測定した CAM の MIC 値は $>256 \mu\text{g}/\text{mL}$ と高値を示した。MLs 耐性遺伝子である *mefA*, *ermA*, *ermB* および *ermC* 遺伝子検索では, どの遺伝子も検出されなかった。23S rRNA におけるドメイン V 領域の塩基配列解析は, 2058 番目のアデニンがチミンに置換されていた (A2058T; *Escherichia coli* numbering)。この 23S rRNA 遺伝子の変異は, MLs 高度耐性化に関連していることが示唆された。今後, *M. catarrhalis* における MLs 高度耐性株の更なる耐性メカニズムの解明および分離頻度の動向に注意していく必要があると考えられた。

Key words: 23S rRNA, *Moraxella catarrhalis*, マクロライド系抗菌薬高度耐性, clarithromycin

序 文

Moraxella catarrhalis は偏性好気性グラム陰性の双球菌である。本菌は, 人の上気道粘膜に付着, 増殖しやすく, しばしば, 呼吸器感染症, 中耳炎および結膜炎などの原因菌として分離される重要な菌種である。

一方, 市中肺炎などの呼吸器感染症の治療において選択される抗菌薬のひとつにマクロライド系抗菌薬 (MLs) がある¹⁾。本抗菌薬は, 呼吸器系組織への優れた移行性を持ち, 広域抗菌スペクトルを有することから, ニューキノロン系抗菌薬と並び使用頻度の高い抗菌薬である。

近年, 呼吸器感染症の原因となる細菌において, MLs

に耐性を示す菌種が増加している。特に MLs に耐性を示す *Mycoplasma pneumoniae* の増加が顕著であり, MLs 耐性株による感染症例が報告されている^{2)~4)}。また, *Streptococcus pneumoniae* および *Streptococcus pyogenes* などの臨床材料由来の菌株において, MLs に対する耐性遺伝子である *mefA* および *ermB* 遺伝子を有し, これらの菌種での耐性化の報告が増加している^{5)~7)}。このように, その他の呼吸器感染症の原因菌となる菌種における MLs 耐性株の分離には注意をする必要がある。

臨床材料から分離される *M. catarrhalis* の多くは β -ラクタマーゼを産生し, ペニシリン系抗菌薬に耐性を示すが, それ以外の多くの抗菌薬に感性を示すことが知られている⁸⁾。近年, 中国⁹⁾や国内¹⁰⁾において MLs に高度耐性を示す株が分離されたが, 世界的に本菌の MLs 高度耐性に関わる分子機構のデータは不足している。今回, われわれは市中肺炎患者の喀痰から MLs 高度耐性を示す *M. catarrhalis* を分離し, その耐性メカニズムの解明を試みたので報告する。

著者連絡先: (〒173-0015) 東京都板橋区栄町 33-1
公益財団法人東京都保健医療公社豊島病院検査科
山田景土
TEL: 03-5375-1234
FAX: 03-5944-3512

Table 1. Primer used to detect *mefA*, *ermA*, *ermB*, *ermC* and 23S rRNA gene in *Moraxella catarrhalis*

Target gene		Primer sequence (5' → 3')	GC (%)	Amplicon size (bp)
23S rRNA	Forward	TAGCGTAAGCGAAGCTCTTG	50.0	421
	Reverse	TTCGTACTCCTCCGTTACTC	50.0	
<i>ermA</i>	Forward	TCACACGAATATCAGTAAAC	35.0	445
	Reverse	TACAGAGTCTACACTTGGC	47.4	
<i>ermB</i>	Forward	CGTACCTTGGATATTCACCG	50.0	224
	Reverse	GTA AACAGTTGACGATATTCTCG	39.1	
<i>ermC</i>	Forward	CCCTTGAATTAGTACAGAGG	55.3	264
	Reverse	TAGCAA AACTCGTATTCCACG	45.0	
<i>mefA</i>	Forward	CTGTATGGAGCTACCTGTCTGG	54.5	402
	Reverse	CCCAGCTTAGGTATACGTAC	50.0	

材料と方法

1. 対象菌株および患者背景

対象菌株は当院において、2012年1月から7月に調査した *M. catarrhalis* 96株のうち耐性株1株 (THMLsRMC001) である。同時に、当院小児患者の後鼻腔粘液より分離された MLs 感性の *M. catarrhalis* (TS-1) をコントロールとした。

耐性株が分離された患者は82歳の男性、耐性菌の分離材料は喀痰であった。喀痰の肉眼正常はP3であり、鏡検所見はGeckler5でグラム陰性球菌の貪食を認めていた。患者は基礎疾患として気管支拡張症を有しており、臨床的にはA型インフルエンザに続発した気管支炎と診断された。

2. 方法

a. 菌種の同定

菌種同定は、コロニーの性状、グラム染色所見およびIDテストHN-20ラピッド「ニッスイ」(日水製薬株式会社)を用いた。

b. 薬剤感受性検査

薬剤感受性検査はClinical and Laboratory Standards Institute M45-A2¹¹⁾に準拠したDisk拡散法で行った。即ち、ミューラーヒントン寒天培地(ベクトンディッキンソン社)にMcFarland No.0.5に調整した菌液を3重塗布し、35℃、5%炭酸ガス条件下で20時間培養後、阻止円径を計測した。Disk(ベクトンディッキンソン社)はclarithromycin (CAM), erythromycin (EM), clindamycin (CLDM) および amoxicillin/clavulanate (AMPC/CVA) を使用した。CAM

に対する阻止円径が24mmより小さいものをMLs耐性と判定した。THMLsRMC001株およびTS-1株は、E-test(シスメックスビオメリュー社)を用いてMIC値を測定した。E-testはCAM, EM, CLDM, azithromycin (AZM) を用いた。

精度管理株として *Staphylococcus aureus* ATCC 29213を用いた。

c. *erm* および *mef* 遺伝子の解析

mefA および *ermB* 遺伝子の検索はペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) 遺伝子検出試薬 ver. 2.0 (湧永製薬) のプライマーミックスCを使用し、PCR法を実施した。サーマルサイクラーはGeneAmp PCR System 9600R (PERKIN ELMER社)を用いた。TE bufferを用いてMcFarland No.4相当に菌浮遊液を調整し60℃で10分加温後に攪拌、さらに95℃で5分熱処理した後に、12000 rpmで3分間遠心した上清を template DNA 溶液とした。反応条件は、熱変性94℃ (15秒)、アニーリング53℃ (15秒) および伸長72℃ (15秒) を30cycles行った。陽性コントロールはキット付属の物を用いた。

ermA および *ermC* 遺伝子の検索はmultiplex PCR法を用いた。Primer(オベロンバイオテクノロジー社)は *S. aureus* (*ermA*; GenBank accession no. BA000018, *ermC*; GenBank accession no. CP000258) を基に作成した (Table 1)。反応溶液の詳細は、TaKaRa Taq (TaKaRa社)を用い、25 pmolのForward および Reverse primer, 5 nmol dNTP, 0.65 unit Taq DNA polymerase を24.75 μlに調整し、0.25 μlの

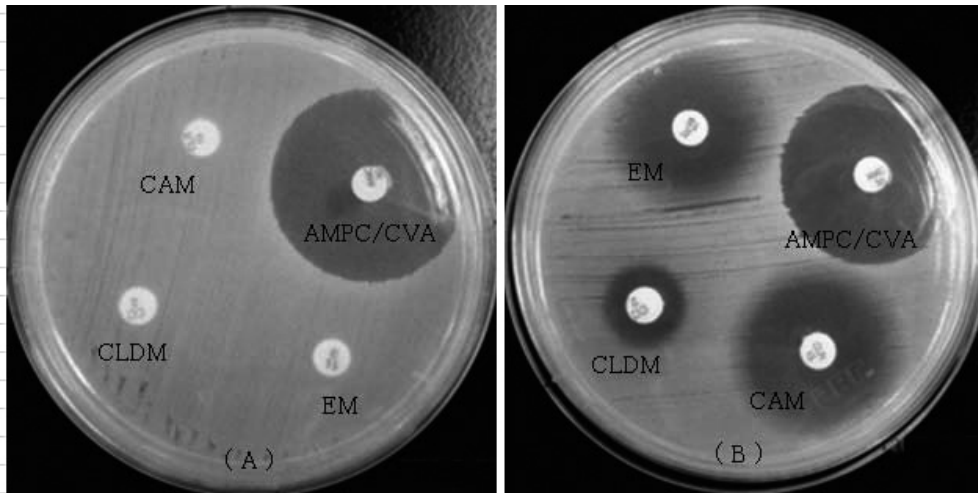


Fig. 1. Drug susceptibility test result by using clarithromycin, erythromycin, clindamycin and amoxicillin/clavulanate in Disk diffusion
(A) THMLsRMC001
(B) TS-1

template DNA 溶液を加え、25 μ l とした。PCR 反応条件は熱変性 94 $^{\circ}$ C (5 分) 後、熱変性 94 $^{\circ}$ C (30 秒)、アニーリング 53 $^{\circ}$ C (30 秒) および伸長 72 $^{\circ}$ C (1 分) を 28 cycles 行い、最後に伸長 72 $^{\circ}$ C (5 分) を行った。陽性コントロールとして当院臨床検体より分離した *S. aureus* を使用した。得られた増幅産物は 2.5% Agarose gel (オベロンバイオテクノロジー社) で電気泳動を行い、ethidium bromide (Invitrogen 社) で染色し、トランスイルミネーター下で写真撮影した。

d. 23S rRNA 遺伝子の解析

23S rRNA 遺伝子における増幅部位の Primer は、データベースから検索した *M. catarrhalis* RH4 (GenBank accession no. CP002005) を基に、23S rRNA 遺伝子ドメイン V 付近に作成した (Table 1)。PCR 法は TaKaRa Taq を使い、サーマルサイクラーは GeneAmp PCR System 9600R を用いた。反応溶液の詳細は、25 pmol の Forward および Reverse primer, 5 nmol dNTP, 0.65 unit Taq DNA polymerase を 24.75 μ l に調整し、0.25 μ l の template DNA 溶液を加え、25 μ l とした。PCR 反応条件は熱変性 94 $^{\circ}$ C (5 分) 後、熱変性 94 $^{\circ}$ C (30 秒)、アニーリング 55 $^{\circ}$ C (30 秒) および伸長 72 $^{\circ}$ C (1 分) を 32 cycles 行い、最後に伸長 72 $^{\circ}$ C (5 分) を行った。得られた増幅産物は 2.5% Agarose gel で電気泳動を行い、ethidium bromide で染色し、トランスイルミネーター下で写真撮影した。増幅産物はフェノール抽出後、フェノール/クロロホルム抽出

により Agarose gel より精製し、3730xl/DNA Analyzer (Applied biosystems 社) を用いて sequence を得た。得られた塩基配列は、BLAST を用いて *M. catarrhalis* RH4 (GenBank accession no. CP002005) と比較した。さらに Saito¹⁰⁾ の方法を用い、23S rRNA のアレル特異的 PCR を実施し、*M. catarrhalis* における 23S rRNA オペロンの 4 箇所をそれぞれ特異的に増幅し、同様に sequence 解析を実施した。

結 果

M. catarrhalis と同定された菌株のうち、CAM 耐性と判定された THMLsRMC001 株および TS-1 株の薬剤感受性結果を Fig. 1 に示す。THMLsRMC001 株では、AMPC/CVA を除き、EM, CAM および CLDM において阻止円を認めなかった。E-test の結果は EM, CAM, AZM および CLDM に対する MIC 値が >256 μ g/mL であり、THMLsRMC001 株は TS-1 株と比較すると MIC 値の著しい上昇が観察された (Table 2)。THMLsRMC001 株は、リンコマイシン系抗菌薬である CLDM にも高度耐性化が観察された。

mefA, *ermA*, *ermB* および *ermC* 遺伝子をターゲットとした PCR 法では、THMLsRMC001 株および TS-1 株、ともに増幅産物は確認されなかった (Fig. 2)。

23S rRNA 遺伝子をターゲットとした PCR 結果では、THMLsRMC001 株、TS-1 株ともに 400 bp 付近

Table 2. Drug susceptibility test result by using E-test

Strains	MIC($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	EM	CAM	AZM	CLDM
TS-1	0.19	0.125	0.094	1.5
THMLsRMC001	>256	>256	>256	>256

EM; erythromycin, CAM; clarithromycin, AZM; azithromycin, CLDM; clindamycin

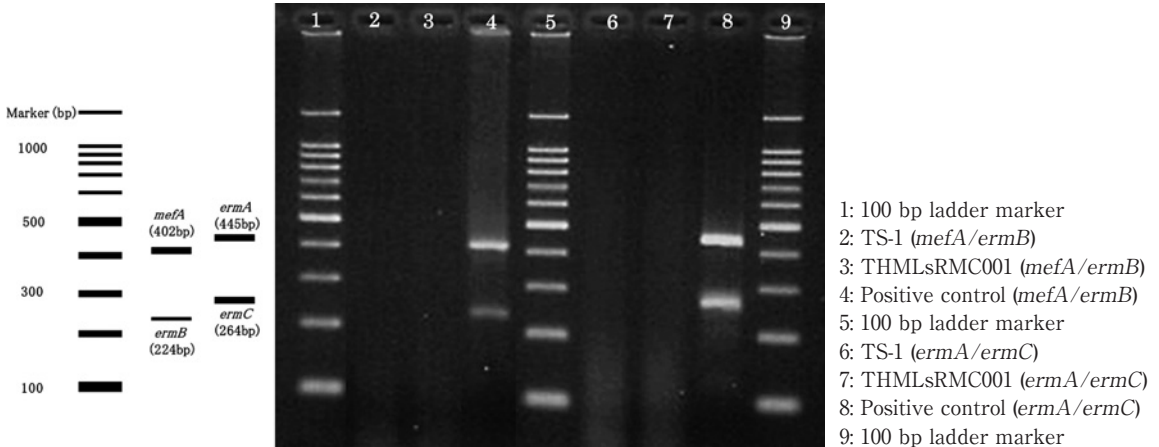


Fig. 2. Result to detect *mefA*, *ermA*, *ermB* and *ermC* gene by using multiplex PCR

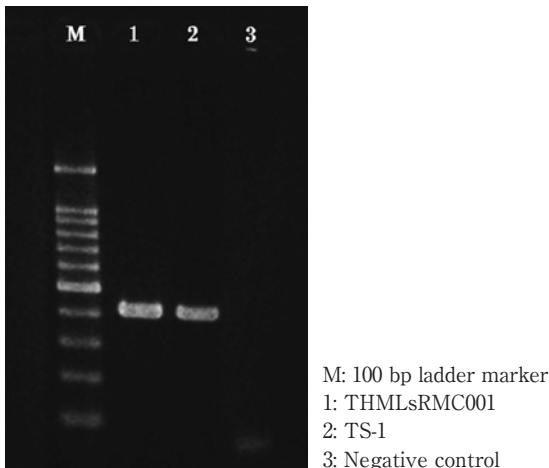


Fig. 3. Result of gene amplification based on PCR shows 23S rRNA gene to be specific to *Moraxella catarrhalis*

に増幅産物が確認された (Fig. 3)。増幅産物の sequence を BLAST 解析した結果, Table 1 の Primer を用いることにより, *M. catarrhalis* の 23S rRNA 遺

伝子を正確に増幅できることが確認された (Fig. 4)。23S rRNA 遺伝子の相同性解析では, 2058 番目のアデニンからチミンへの置換 (A2058T; *Escherichia coli* numbering (Genbank accession no. V00331)) が認められた。また, 2211 番目のシトシンからチミンへの置換 (C2211T; *E. coli* numbering (Genbank accession no. V00331)) も同時に認められた (Fig. 4)。

アレル特異的な PCR により THMLsRMC001 株はゲノム上 4 つのアレル全てにおいて A2058T の変異を認めた (データ示さず)。

考 察

今回, 我々は MLs に高度耐性を示す *M. catarrhalis* (THMLsRMC001 株) を経験した。本来, *M. catarrhalis* は MLs に対し, 良好な感受性を示す。このことは, 小林らが *M. catarrhalis* に対する MLs 抗菌活性は優れた成績であり, 100 株調査した全ての株に CAM が有効であったと報告している¹²⁾。

また, 今回耐性菌が分離された患者は 80 歳代の男性であり, 過去に CAM を 5 年間に渡り投与された経歴を有しており, 患者宿主に耐性株が選択的に付着・

		10			60
<i>M. catarrhalis</i> RH4	GGTCCTAAGG	TAGCGAAATT	CCTTGTCTGGG	TAAGTTCGGA	CCTGCACGAA TGGCATAATG
TS-1	GGTCCTAAGG	TAGCGAAATT	CCTTGTCTGGG	TAAGTTCGGA	CCTGCACGAA TGGCATAATG
THMLsRMC001	GGTCCTAAGG	TAGCGAAATT	CCTTGTCTGGG	TAAGTTCGGA	CCTGCACGAA TGGCATAATG
		70			120
<i>M. catarrhalis</i> RH4	ATGGCAGCGC	TGTCTCCAGC	AGAGACTCAG	TGAAATCGAA	ATCGCAGTGA AGATGCTGTG
TS-1	ATGGCAGCGC	TGTCTCCAGC	AGAGACTCAG	TGAAATCGAA	ATCGCAGTGA AGATGCTGTG
THMLsRMC001	ATGGCAGCGC	TGTCTCCAGC	AGAGACTCAG	TGAAATCGAA	ATCGCAGTGA AGATGCTGTG
		130			180
<i>M. catarrhalis</i> RH4	TACCCGCGGC	TAGACGGAAA	GACCCCGTGA	ACCTTTACTA	CAGCTTTACA TTGAACTTTG
TS-1	TACCCGCGGC	TAGACGGAAA	GACCCCGTGA	ACCTTTACTA	CAGCTTTACA TTGAACTTTG
THMLsRMC001	TACCCGCGGC	TAGACGGAAA	GACCCCGTGA	ACCTTTACTA	CAGCTTTACA TTGAACTTTG
		190			240
<i>M. catarrhalis</i> RH4	ACCTAACTTG	TGTAGGATAG	GTGGGAGGCT	TTGAAGCAGA	TACGCCAGTA TTTGTGGAGC
TS-1	ACCTAACTTG	TGTAGGATAG	GTGGGAGGCT	TTGAAGCAGA	TACGCCAGTA TTTGTGGAGC
THMLsRMC001	ACCTAACTTG	TGTAGGATAG	GTGGGAGGCT	TTGAAGCAGA	TACGCCAGTA TTTGTGGAGC
		250			300
<i>M. catarrhalis</i> RH4	CAACCTTGAA	ATACCACCCT	GGTTATGTTG	GGGTTCTAAC	TTAGGATCAA CAAATCCAAG
TS-1	CAACCTTGAA	ATACCACCCT	GGTTATGTTG	GGGTTCTAAC	TTAGGATCAA CAAATCCAAG
THMLsRMC001	CAACCTTGAA	ATACCACCCT	GGTTATGTTG	GGGTTCTAAC	TTAGGATCAA CAAATCCAAG
		310			360
<i>M. catarrhalis</i> RH4	GACAATGTAT	GGTGGGTAGT	TTGACTGGGG	CGGTCTCCTC	CTAAAGAGTA ACGGAGGAGT
TS-1	GACAATGTAT	GGTGGGTAGT	TTGACTGGGG	CGGTCTCCTC	CTAAAGAGTA ACGGAGGAGT
THMLsRMC001	GACAATGTAT	GGTGGGTAGT	TTGACTGGGG	CGGTCTCCTC	CTAAAGAGTA ACGGAGGAGT

Fig. 4. Homology analysis of partial 23s rRNA gene in *Moraxella catarrhalis* strains. (Nucleotide number 138 corresponds to A2058 in *Escherichia coli* (Genbank accession no. V00331). *M. catarrhalis* RH4; Genbank accession no. CP002005)

増殖したと考えられた。

MLsの作用標的はリボソーム中の23S rRNAであり、23S rRNAはリボソームにおける50Sサブユニットの構成RNAである。50Sサブユニットの中でペプチルトランフェラーゼの機能によりアミノ酸が繋がれポリペプチドが合成されるが、その際に重要な働きをするのが23S rRNAである。MLsはポリペプチド合成における機能部位のドメインVに結合し、ポリペプチド合成を阻害することで抗菌薬としての機能を発揮する。一般的にMLsに耐性化する要因は数種類存在することが知られており¹³⁾、*M. catarrhalis*と同様、呼吸器感染症を引き起こす*S. pneumoniae*では、MLs耐性機序が主に2種類存在することが知られている。検出頻度の高さと耐性度の強さから問題となっているのが、*ermB*遺伝子である。*ermB*遺伝子はMLsの作用標的である23S rRNAをメチル化するメチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子であり、*ermB*遺伝子が発現している菌種では23S rRNAをジメチル化することで、MLsに耐性を示すことが報告されている¹⁴⁾。もう1つの耐性機序は、薬剤排出亢進による耐性化である。この耐性には*mefA*遺伝子が関係しており、*mefA*遺伝子はMLsの排出タンパクをコードする遺伝子であり、*mefA*遺伝子を有する菌種ではMLsに中等度耐性を示すことが報告されてい

る¹⁵⁾。

また、*S. pneumoniae*の*ermB*と同様に23S rRNAをメチル化し、*S. aureus*においてMLsに耐性を示す*ermA*および*ermC*遺伝子も知られている。

今回の調査ではTHMLsRMC001株において、*mefA*、*ermA*、*ermB*および*ermC*遺伝子は検出されなかった。このことから、本菌株のMLsにおける耐性機序は*mefA*、*ermA*、*ermB*および*ermC*遺伝子に起因していないと推察された。通常、MLs耐性*S. pneumoniae*におけるMLs耐性遺伝子*ermB*はトランスポゾンにより拡散すると考えられている¹⁶⁾が、*mefA*、*ermA*、*ermB*および*ermC*遺伝子が検出されなかったTHMLsRMC001株では、両遺伝子が他菌種から伝播されていないことが示唆された。

一方で、MLsに対する耐性機序として23S rRNA中の塩基置換が知られている。*M. pneumoniae*のMLs高度耐性化は、23S rRNAの塩基置換が関与しており、その変異部位の多くは、23S rRNAのドメインVにおける2063および2064番目のアデニンであることが報告されている¹⁷⁾。23S rRNAは塩基配列こそ異なるが、その二次構造は菌種を超えて高度に保存されていることが知られている¹⁸⁾。今回、*M. catarrhalis*において変異が確認されたA2058Tは、ドメインVのセントラルループ構造の一領域であり、*M. pneumo-*

niae では 2063 番目のアデニンに相当し、MLs に高度耐性化する変異部位であることが判明した。この阻害部位は多くの細菌に共通であり、MLs 耐性化のホットスポットであると言われている¹⁹⁾。今回分離した *M. catarrhalis* は A2058T の変異により MLs に高度耐性化していると推察され、リンコマイシン系抗菌薬である CLDM も MLs と作用標的が一部同一であるため、MLs と同様に高度耐性化したと考えられた。

Saito ら¹⁰⁾ は *M. catarrhalis* において、23S rRNA のオペロンはゲノム中に 4 箇所存在し、そのうち 3 箇所以上のオペロンにおいて A2058T の変異を認めた場合、MLs に高度耐性化すると報告している。Saito らの方法を用いて追加試験を行ったところ THMLsRMC001 株では、A2058T の変異は 4 箇所確認された。本邦において、同時期にこのような耐性株が分離されたことは非常に興味深い。

今回、我々が解析したのは 23S rRNA 遺伝子の一部分であり、全長を解析することでその他の耐性要因を見出す可能性や MLs 不活化酵素の存在も否定できないため、今後の更なる研究に期待したい。

近年、抗菌薬に対して高度な耐性を獲得した病原菌が散在しているなかで、日本呼吸器学会のガイドラインによる成人市中肺炎診療ガイドライン²⁰⁾において細菌性肺炎疑いの場合は、β-ラクタマーゼ阻害薬配合ペニシリン系薬剤が推奨されているが、MLs が使用されるケースも少なくないと考えられる。今回分離された MLs 高度耐性 *M. catarrhalis* も、臨床現場で多用される MLs の影響であると考えられたことから、今後の MLs 耐性 *M. catarrhalis* の増加に注意していく必要がある。

文 献

- 1) 工藤翔二, 植竹健司, 荻原弘一, 他. 1987. びまん性汎細気管支炎に対するエリスロマイシン少量長期投与の臨床効果に関する研究—4 年間の治療成績. 日胸疾会誌 25: 632-642.
- 2) 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 (8): 617-620.
- 3) Suzuki, S, T Yamazaki, M Narita, et al. 2006. Clinical evaluation of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 50 (2): 709-712.
- 4) Isozumi, R, H Yoshimine, M Morozumi, et al. 2009. Adult case community-acquired pneumonia caused by macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*. Respirol. 14: 1206-1208.
- 5) 富田亜紀子, 篠田陽子, 安原 努, 他. 2006. ペニシリン耐性肺炎球菌におけるマクロライド耐性遺伝子の保有状況の解析. 臨床病理 54: 792-799.
- 6) 井上松久, 兼子謙一, 中野竜一, 他. 2004. マクロライド及びケトライド耐性肺炎球菌の分子解析による評価—Telithromycin の作用機序・耐性機序も含めて—. Jap. J. Antibiot. 57: 425-437.
- 7) 清水千裕, 中村竜也, 田中敬一郎, 他. 2006. *Streptococcus pyogenes* のマクロライド系薬剤耐性と Telithromycin 耐性株の機序についての考察. 医学検査 55: 992-997.
- 8) Doern, G V, R N. Jones, M A. Pfaller, et al. 1999. *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from patient with community-acquired respiratory tract infections: antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). Antimicrob. Agents Chemother. 43: 385-389.
- 9) Liu, Y, C Zhao, F Zhang, et al. 2012. High prevalence and molecular analysis of macrolide-nonsusceptible *Moraxella catarrhalis* isolated from nasopharynx of healthy children in China. Microb. Drug Resist. 18: 417-426.
- 10) Saito, R, S Nonaka, H Nishiyama, et al. 2012. Molecular mechanism of macrolide-lincosamide resistance in *Moraxella catarrhalis*. J. Med. Microbiol. 61: 1435-1438.
- 11) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline- second Edition. CLSI document M45-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania.
- 12) 小林寅喆, 田代みさき, 館脇光弘, 他. 2007. クラリスロマイシンの呼吸器感染症主要病原菌に対する抗菌活性. 新薬と臨床 56: 629-639.
- 13) 松岡真由美, 中島良徳. 1999. マクロライド系薬剤の耐性機序—臨床分離細菌を中心に. 医学のあゆみ 191: 1041-1045.
- 14) Trieu-Cuot, P, C Poyart-Salmeron, C Carlier, et al. 1990. Nucleotide sequence of the erythromycin resistance gene of the conjugative transposon Tn1545. Nucleic Acids Res. 18: 3660.
- 15) Tait-Kamradt, A, J Clancy, M Cronan, et al. 1997. *meffE* is necessary for the erythromycin-resistant M

- phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2251-2255.
- 16) Okitsu, N, S Kaieda, H Yano, et al. 2005. Characterization of *ermB* gene transposition by Tn1545 and Tn917 in macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43: 168-173.
- 17) 大屋日登美, 岡崎則男, 鈴木五三男, 他. 2007. 神奈川県におけるマクロライド耐性肺炎マイコプラズマの分離状況. *日本マイコプラズマ学会雑誌* 34: 56-59.
- 18) 遠藤弥重太. 1998. リボソーム機能に関する最近の2つの発見—リボソーム RNA がペプチド結合を触媒する—. *蛋白質 核酸 酵素* 43: 2199-2205.
- 19) Vester, B, S Douthwaite. 2001. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1-12.
- 20) 日本呼吸器学会成人市中肺炎診療のためのガイドライン作成委員会. 2007. 成人市中肺炎診療ガイドライン. 日本呼吸器学会.

Molecular Analysis of Macrolide-Nonsusceptible *Moraxella catarrhalis*

Kageto Yamada¹⁾, Machiko Kashiwa¹⁾, Haruko Kazama²⁾, Ryoichi Saito³⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Toshima Hospital

²⁾Department of Clinical Laboratory, Bokuto Hospital

³⁾Department of Microbiology and Immunology, Graduate School of Health Care Sciences, Tokyo Medical and Dental University

Moraxella catarrhalis produces β -lactamase, is known to be a causative agent of pneumonia. Through basic analysis, here we report that we analyzed the mechanism of resistance in *M. catarrhalis*, and found *M. catarrhalis* showed high-level resistance to macrolide antibiotics. Drug susceptibility tests by disk diffusion with clarithromycin, erythromycin, clindamycin and amoxicillin/clavulanate (AMPC/CVA) showed high-level resistance to macrolide antibiotics with exception of AMPC/CVA. Although we further performed PCR to detect *mefA*, *ermA*, *ermB* and *ermC* gene, none of these genes were detected. Analysis of 23S rRNA gene mutation using PCR and sequencing revealed one point mutation in 23S rRNA (A2058T; *Escherichia coli* numbering) which is considered as a cause of high-level resistance to macrolide antibiotics. Due to predicted increase in high-level macrolide antibiotics resistant *M. catarrhalis* strains in the future, therefore, we need to focus on the rate of dispersion.