

[原 著]

秋田県の一医療機関で小児科臨床材料から分離されたマクロライド高度耐性
Moraxella catarrhalis 及び *Moraxella nonliquefaciens* の解析

佐藤慶子¹⁾・八柳 潤²⁾・井川ジーン³⁾・齋藤良一³⁾

¹⁾ 秋田赤十字病院検査部

²⁾ 秋田県健康環境センター細菌班

³⁾ 東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科生体防御検査学分野

(平成 27 年 7 月 22 日受付, 平成 28 年 7 月 19 日受理)

Moraxella catarrhalis は小児における上気道炎や下気道炎, 中耳炎などの感染症の起原因菌である。一方, *Moraxella nonliquefaciens* は上気道の常在菌であり病原性は低いと考えられているが, 呼吸器ウイルスに感染した小児の上気道から高率に分離され, 病原性と関連すると考えられるタンパク質をコードしているとの報告もある。今回, われわれは秋田県の一医療機関において小児科の臨床材料から分離された, マクロライド高度耐性 *M. catarrhalis* と *M. nonliquefaciens* の耐性機構について検討した。供試した *M. catarrhalis* 3 株は全て 23S rRNA 遺伝子の Allele1 から 4 の全てに A2058T 変異を保有していた。また, *M. nonliquefaciens* 3 株も全て 23S rRNA 遺伝子に A2058T 変異を保有していた。6 株はいずれも *ermA*, *ermB*, *ermC*, *mefA* 遺伝子を保有していなかった。以上の結果は, 23S rRNA 遺伝子の A2058T 変異によりマクロライド系抗菌薬に高度耐性を獲得した *M. catarrhalis* と *M. nonliquefaciens* が国内に侵淫している事実を示唆している。国内におけるマクロライド高度耐性 *M. catarrhalis* 及び *M. nonliquefaciens* のサーベイランスを強化し, 今後の動向を監視する必要がある。

Key words: *Moraxella catarrhalis*, *Moraxella nonliquefaciens*, マクロライド高度耐性, A2058T 変異, 23S rRNA 遺伝子

序 文

Moraxella catarrhalis はグラム陰性好気性双球菌であり, 特に小児における上気道炎や下気道炎, 中耳炎などの感染症起原因菌である¹⁾。*M. catarrhalis* は 90% 以上が β ラクターマーゼを産生してペニシリン系抗菌薬に耐性を示すが, その他の多くの抗菌薬には感性であることが報告されている²⁾。しかしながら, 近年マクロライド系抗菌薬に高度耐性を示す *M. catarrhalis* が本邦や中国で報告されている^{3)~5)}。

マクロライド系抗菌薬は 23S rRNA 遺伝子に結合

しレプチド鎖の伸長を阻害する⁶⁾。細菌のマクロライド耐性機構としては, 一般的に薬剤の標的部位の修飾又は変異, 薬剤の排出促進, 酵素による薬剤の不活化が知られており, 臨床由来のマクロライド耐性菌の多くは薬剤の標的部位の修飾又は変異によりマクロライド耐性を示す⁷⁾。*M. catarrhalis* のマクロライド耐性機構としては, 薬剤の排出促進, *ermA* などの 23S rRNA メチラーゼによる 23S rRNA の修飾, 23S rRNA domain V の変異などが関与することが知られている^{6)8)~10)}。マクロライド系抗菌薬は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である¹¹⁾ことから, 高度耐性を獲得した *M. catarrhalis* が呼吸器感染症の治療上問題となる可能性がある。一方, *Moraxella nonliquefaciens* は上気道の常在菌であり病原性は低いと考えられている¹²⁾が, インフルエンザウイルス, パラインフルエンザウイルス, ライノウイルスなどの呼吸器ウイルスに感染した 6 歳以下の患者の上気道か

著者連絡先: (〒010-1495) 秋田市上北手猿田字苗代沢 222-1
秋田赤十字病院検査部
佐藤慶子
TEL: 018-829-5000 内線 5617
E-mail: kensa@archosp-1998.com

ら高率に分離されることや病原性と関連すると考えられるタンパク質をコードしているとの報告¹³⁾もあり、呼吸器感染症における病原性には議論がある。Nonakaら¹⁴⁾は *M. nonliquefaciens* にも高度マクロライド耐性株が存在することを報告しており、*M. nonliquefaciens* が関連する呼吸器疾患においても治療上の問題となる可能性が示唆されている。

近年、マクロライド高度耐性 *M. catarrhalis* 及び *M. nonliquefaciens* が本邦に侵入した経過については不明な点が多い。その侵入過程を明らかにする上で、分離株の分子疫学的性状を比較検討することは重要であると考えられるが、本邦で分離されたマクロライド高度耐性 *M. catarrhalis* 及び *M. nonliquefaciens* の分子疫学的性状について検討した報告は見当たらない。

今回、われわれは小児の鼻腔および咽頭から分離された *M. catarrhalis* 及び *M. nonliquefaciens* についてマクロライド系抗菌薬に対する耐性機構を解析すると共に、耐性株の分子疫学的特徴についても検討したので報告する。

材料と方法

1. 供試株

2013年2月から10月に秋田赤十字病院小児科受診患者気道検体より分離された *Moraxella* 属菌 86 株のうち Clarithromycin (CAM) に耐性を示した *Moraxella catarrhalis* 3 株 (OT171, OT185, OT202), *Moraxella nonliquefaciens* 3 株 (OT179, OT195, OT197) の計 6 株を供試株とした (検出株数の集計は同一患者より同種菌が検出された場合は重複削除を行った)。CAM 耐性と判定された分離菌株は 10 株であったが、そのうち保存後発育を認め薬剤感受性試験や遺伝子解析の実施が可能であったのは 6 株であった。分離株は 15% スキムミルクに懸濁して -80°C で保存した。保存株の培養にはチョコレート寒天平板培地 (日本 BD) を使用し、培養条件は 35°C 2 日間炭酸ガス培養を行った。

2. 菌種の同定

供試株の菌種同定は、1 次同定として VITEK2 の NH 同定カードまたは GN 同定カード (シスメックスバイオメリユー) を用いて実施した。自動同定機器にて *M. catarrhalis* および *Moraxella* group と同定された菌株に対し、Ferroni ら¹⁵⁾ の報告に従い 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析にて菌種同定を行った。

3. 薬剤感受性試験

マクロライド系抗菌薬耐性株を検出するために、スクリーニング的に Disk 拡散法にて CAM に対する薬

剤感受性試験を行った。*M. catarrhalis* はミューラーヒントン寒天培地 (日本 BD) を用い、試験方法は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M45-A2⁶⁾ に準拠した。*M. nonliquefaciens* は CLSI で定められた薬剤感受性試験法がないため、5% 羊血液加ミューラーヒントン寒天培地 (日本 BD) を用い、CLSI M45-A2 の *M. catarrhalis* の Disk 拡散法の勧告法に準拠し感受性試験を実施した。Disk はセンシディスク クラリスロマイシン 15 (日本 BD) を用い、阻止円径が 24 mm より小さいものを CAM 耐性と判定した。

CAM 耐性と判定された供試株に対して E-test (シスメックスバイオメリユー) により CAM, Erythromycin (EM), Clindamycin (CLDM), および Azithromycin (AZM) について最小発育阻止濃度 (MIC) 値を測定した。*M. catarrhalis* の各薬剤に対する測定方法はメーカー推奨法に従った。*M. nonliquefaciens* は、5% 羊血液加ミューラーヒントン寒天培地 (日本 BD) を用い、*M. catarrhalis* に対するメーカー推奨法にて MIC 値を測定した。

精度管理株として *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 を用いた。

4. マクロライド耐性遺伝子の検出

耐性遺伝子の検出は、山田ら⁵⁾ が報告した PCR 法を用いて *ermA*, *ermB*, *ermC*, *mefA* 遺伝子の有無を調査した。QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) を使用して供試株の DNA を抽出し、PCR 用テンプレートとした。Taq DNA Polymerase には Takara EX Taq (タカラバイオ) を使用した。サーマルサイクラーには GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を使用し、PCR 反応条件は前熱変性 94°C 3 分実施後、熱変性 94°C 30 秒、アニーリング 55°C 60 秒、伸長 72°C 60 秒を 35 サイクル実施し、その後最終伸長 (72°C 2 分) を実施した。

ermB および *mefA* 遺伝子の陽性コントロールとして当院臨床検体より分離した *Streptococcus pneumoniae* (OT-SP) を使用し、*ermA* および *ermC* 遺伝子の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* (OT-SA) を使用した。

5. 23S rRNA 遺伝子のシーケンス解析

a. *M. nonliquefaciens* の 23S rRNA 遺伝子シーケンス解析

M. nonliquefaciens ATCC 17953 の 23S rRNA 遺伝子シーケンス (GenBank accession no. AB745464) に基づき、23S rRNA 遺伝子ドメイン V の 516 bp を増幅するプライマー *M.nonliquefaciens_23S_F* (5'-

TTC CGA CCT GCA CGA ATG GCA-3') と *M. nonliquefaciens*_23S_R (5'-ACT CTT GGG CGG TAT CAG CCT-3') を設計した。Taq DNA Polymerase には Takara EX Taq (タカラバイオ) を使用した。PCR 反応条件は前熱変性 94°C 3 分実施後、熱変性 94°C 30 秒、アニーリング 55°C 60 秒、伸長 72°C 60 秒を 35 サイクル実施し、その後最終伸長 (72°C 2 分) を実施した。得られた増幅断片をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を使用して精製し、シークエンス反応用のテンプレートとした。シークエンスプライマーに *M. nonliquefaciens*_23S_F と *M. nonliquefaciens*_23S_R を使用し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) によりシークエンス反応を実施した後、Applied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems) によりシークエンスデータを得た。DNA シークエンスの解析には DNASIS Pro (日立ソフト) を使用した。*M. nonliquefaciens* 23S rRNA 遺伝子シークエンスの塩基ナンバーは、*Escherichia coli* W ATCC 9637 の 23S rRNA 遺伝子シークエンス (GenBank accession no. NC017664, 2906 bp) を基準として表記した。

b. *M. catarrhalis* の 23S rRNA 遺伝子シークエンス解析

Saito ら⁴⁾の報告に従い 23S rRNA 遺伝子の Allele 特異的 PCR を行い、23S rRNA 遺伝子オペロン 4 カ所 (Allele 1~Allele 4) を増幅し、シークエンスを決定した。得られたシークエンスを *M. catarrhalis* ATCC 49143 (GenBank accession no. AB734416) の 23S rRNA 遺伝子シークエンスと比較し、変異が認められた塩基ナンバーを *Escherichia coli* W ATCC 9637 の 23S rRNA 遺伝子シークエンス (GenBank accession no. NC017664, 2906 bp) を基準として表記した。

6. 分子疫学解析

保存後の供試株のうち起眠できた *M. catarrhalis* 2 株 (OT185, OT202) および *M. nonliquefaciens* 3 株 (OT179, OT195, OT197) を用いて、Sechi ら¹⁷⁾の方法に従い Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR を行った。増幅産物は 2% アガロースゲル電気泳動により分離し、エチジウムブロマイド染色後、バンドパターンのプロファイルを比較した。

結 果

1. CAM 耐性 *M. catarrhalis* 及び *M. nonliquefaciens* の分離状況

検索期間に分離された *Moraxella* 属株は 86 株であり、そのうち 10 株が CAM に耐性を示した。それら菌株は 16S rRNA 遺伝子のシークエンス解析にて 6 株が *M. catarrhalis*、4 株が *M. nonliquefaciens* と同定された。表 1 にこれら 10 株が分離された患児の背景を示す。CAM 耐性 *M. catarrhalis* が検出された患児の内、マクロライド耐性菌検出以前にマクロライド系抗菌薬投与がなされていたのは 2 例であった。一方、CAM 耐性 *M. nonliquefaciens* が検出された患児では、マクロライド系抗菌薬の前薬投与がなされていたのは 1 例であった。これら 10 株が分離された患児には上・下気道炎などの臨床症状がみられたが、発症時期に特記すべき季節的傾向は認められなかった。

2. CAM 耐性 *M. catarrhalis* 及び *M. nonliquefaciens* の薬剤感受性、マクロライド耐性遺伝子保有状況と 23S rRNA 遺伝子シークエンス変異検出状況

表 2 に示すように、6 株は EM, CAM, AZM, CLDM の全てに 256 µg/ml 以上の MIC 値を示し、供試したマクロライド系抗菌薬に対する高度耐性株であった。6 株はいずれも *ermA*, *ermB*, *ermC*, *mefA* 遺伝子を保有していなかったが、*M. catarrhalis* OT171, OT185, OT202 はいずれも 23S rRNA 遺伝子の Allele 1 から 4 の全てに A2058T 変異を保有していた。*M. nonliquefaciens* OT179, OT195, OT197 も全て 23S rRNA 遺伝子に A2058T 変異を保有していた。*M. nonliquefaciens* に対して *M. catarrhalis* と同様の 23S rRNA 遺伝子 4 Allele の解析を試みたが、全ゲノム解析データが得られなかったために、Allele 解析は実施不能であった。

3. 分子疫学解析

ERIC-PCR を行った結果、2 株の *M. catarrhalis* (OT185 と OT202) は異なるバンドパターンを示した。一方、*M. nonliquefaciens* 3 株のうち OT179 および OT197 が同一バンドパターンを示した (図 1)。

考 察

今回、われわれは小児科由来検体より分離された *Moraxella* 属菌にマクロライド系抗菌薬高度耐性株を見だし、その耐性機構を解析した。その結果、*M. catarrhalis* および *M. nonliquefaciens* のマクロライド系抗菌薬高度耐性株の存在を確認した。全ての供試株で *ermA*, *ermB*, *ermC*, *mefA* 遺伝子は検出され

表 1. Clarithromycin 耐性 *M. catarrhalis* および *M. nonliquefaciens* 検出患児背景一覧

菌名	ケース No	供試株 No.	年齢	検出部位	検出月	同時検出菌	前投与抗菌薬	診断名・臨床症状
<i>M. catarrhalis</i>	1	—	1歳 6ヶ月	鼻腔	2月	—	CAM	急性気管支炎
	2	OT171	2歳 6ヶ月	鼻腔	3月	—	CFPN-PI	EBウイルス感染, 上気道炎
	3	—	2歳 1ヶ月	鼻腔	3月	<i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i>	CAM	急性気管支炎
	4	OT185	1歳	鼻腔	7月	MSSA	ABPC CDTR-PI	急性気管支炎, 発熱, 咳, 嘔吐
	5	—	3歳 7ヶ月	鼻腔	7月	—	CCL	急性気管支炎
	6	OT202	10ヶ月	鼻腔	10月	<i>S. pneumoniae</i>	—	突発性発疹, 咽頭炎, 咳, 痰
<i>M. nonliquefaciens</i>	7	—	3歳 5ヶ月	鼻腔	2月	<i>Corynebacterium</i> <i>sp.</i>	CAM	急性気管支炎
	8	OT179	2歳	鼻腔	6月	<i>H. influenzae</i> <i>S. pneumoniae</i>	CDTR-PI	気管支炎, 上気道炎
	9	OT195	1歳 8ヶ月	鼻腔	8月	<i>M. catarrhalis</i> <i>S. pneumoniae</i>	—	手足口病, 咽頭 発赤, 痰, 鼻閉
	10	OT197	1歳 3ヶ月	鼻腔	9月	<i>H. influenzae</i> <i>S. pneumoniae</i>	—	気管支喘息

CAM : clarithromycin

CFPN-PI : cefcapene pivoxil

ABPC : ampicillin

CDTR-PI : cefditoren pivoxil

CCL : cefaclor

表 2. Clarithromycin 耐性 *M. catarrhalis* 及び *M. nonliquefaciens* 供試株の薬剤感受性, 23S rRNA 遺伝子 mutation, マクロライド耐性遺伝子

菌名	供試株 No.	MIC (µg/ml)				23S rRNA mutation (position 2058)*				マクロライド耐性遺伝子				
		EM	CAM	AZM	CLDM	Allele 1	Allele 2	Allele 3	Allele 4	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>mefA</i>	
<i>M. catarrhalis</i>	OT171	>256	>256	>256	>256	N.D.	A → T	A → T	A → T	A → T	—	—	—	—
	OT185	>256	>256	>256	>256	N.D.	A → T	A → T	A → T	A → T	—	—	—	—
	OT202	>256	>256	>256	>256	N.D.	A → T	A → T	A → T	A → T	—	—	—	—
<i>M. nonliquefaciens</i>	OT179	>256	>256	>256	>256	A → T			N.D.		—	—	—	—
	OT195	>256	>256	>256	>256	A → T			N.D.		—	—	—	—
	OT197	>256	>256	>256	>256	A → T			N.D.		—	—	—	—

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

N.D. : Not Determined

*GenBank accession no. V00331

ず, かつ 23S rRNA 遺伝子の変異が確認された。この結果より, マクロライド耐性の表現型は 23S rRNA 遺伝子の変異に起因すると考えられる。

マクロライド系抗菌薬高度耐性株 *M. catarrhalis* および *M. nonliquefaciens* が国内に出現した機構は明らかではない。一般的に, 薬剤耐性菌の出現には抗菌薬

の濫用が関与すると考えられている。今回の検討では, CAM 耐性 *M. catarrhalis*, *M. nonliquefaciens* が検出された患児の中で, マクロライド系抗菌薬が投与されていた患児が 3 名であったのに対し, なされていなかったのは 7 名であった。今回われわれが検討した 10 例について, 当院では治療のための適切な投与期

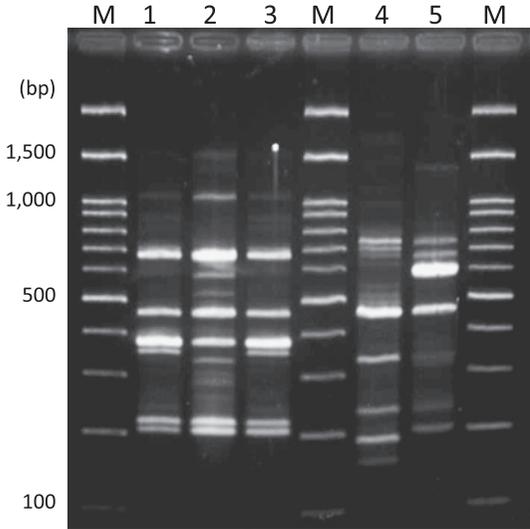


図1. *M. catarrhalis* (OT185 and OT202) 及び *M. nonliquefaciens* (OT179, OT195 and OT197) に対する ERIC-PCR の解析結果
Lane M, 分子量 (100 bp DNA ladder); lane 1, OT179; lane 2, OT195; lane 3, OT197; lane 4, OT185; lane 5, OT202.

間を逸脱するようなマクロライド系抗菌薬の長期投与は実施されていなかったが、当院は3次医療機関であるため、症状が改善されない患者や重篤化した患者が地域の医療機関から紹介されてくる場合が多く、マクロライド系抗菌薬が当院受診前に長期投与されていた可能性は否定できない。一方、マクロライドが投与されず、耐性株の選択圧が存在しない状態においてもマクロライド耐性株が増加する機構としては、変異等により出現したマクロライド耐性株が、健康保菌者等を介した水平伝播により侵淫する可能性が考えられる。*Mycoplasma pneumoniae* においても23S rRNA 遺伝子の変異によりマクロライド系抗菌薬に高度耐性を獲得した株が国内で急速に侵淫した経緯がある¹⁸⁾ことから、今後の国内におけるマクロライド耐性 *M. catarrhalis* と *M. nonliquefaciens* の動向に注目される。

マクロライド系抗菌薬に高度耐性を示す *M. catarrhalis* と *M. nonliquefaciens* 臨床分離株については世界的には報告が少ないが、Nonaka ら¹⁹⁾がマクロライド高度耐性を示す *M. nonliquefaciens* 臨床分離株47株について耐性機構を検討し、23S rRNA 遺伝子にA2058T変異が存在することを報告した。本研究においても供試したマクロライド耐性 *M. nonliquefa-*

ciens 3株がいずれも23S rRNA 遺伝子にA2058T変異の存在を示し、同様の結果であった。一方でマクロライド耐性 *M. catarrhalis* 3株も23S rRNA 遺伝子のAllele1から4の全てにA2058T変異の保有を認める結果となり、こちらもSaito ら⁴⁾の報告と同様の結果であった。Saito ら⁴⁾はAllele変異の数により耐性度が異なることを報告しており、3か所以上の変異を持つ株ではマクロライド抗菌薬に高度耐性となるとしている。今回供試した株は4か所の変異を有しており、表現型で高度耐性となったことが裏付けられるものであった。本結果がこれまでの本邦における報告¹¹⁾と同様の結果を示したことは、23S rRNA 遺伝子のA2058T変異によりマクロライド系抗菌薬に高度耐性を獲得した *M. catarrhalis* と *M. nonliquefaciens* が既に国内に広く侵淫している可能性を示唆するものと考えられる。

ERIC-PCRの結果から、供試した2株の *M. catarrhalis* は異なるクローンであることが示された。このことは、マクロライド高度耐性 *M. catarrhalis* が単一クローンから派生したのではないことを示唆している。一方、3株の *M. nonliquefaciens* のうち2株が同一クローンに属する可能性が示された。3株が検出された患児には接触歴はなく、生活地域も離れている。このことから、より広範に本クローンの菌株が広がっている可能性が考えられる。分離株の分子疫学的特徴に関する知見はマクロライド高度耐性 *Moraxella* 属菌の起源に関する情報となることから、今後、より多くの菌株を用い、そしてより解析力の高いパルスフィールドゲル電気泳動法、あるいは全染色体のSNP解析などを併用しながら、マクロライド高度耐性 *M. catarrhalis* と *M. nonliquefaciens* 分離株の分子疫学的特徴をより詳細に検討する必要がある。

今回のわれわれの検討により、秋田県内の医療機関においても23S rRNA 遺伝子のA2058T変異によりマクロライド高度耐性を獲得した *M. catarrhalis* 及び *M. nonliquefaciens* が小児科由来の呼吸器臨床材料から分離されたことが確認された。*M. nonliquefaciens* の臨床的意義については議論があるものの、今後、マクロライド高度耐性 *M. catarrhalis* 及び *M. nonliquefaciens* が呼吸器感染症の治療上問題となる可能性が示唆されることから、国内におけるマクロライド高度耐性 *M. catarrhalis* 及び *M. nonliquefaciens* のサーベランスを強化し、今後の動向を広く監視する必要がある。

利益相反：申告すべき利益相反なし。

文 献

- 1) Verduin, C. M., C. Hol, A. Fleer, et al. 2002. *Moraxella catarrhalis*: from emerging to established pathogen. Clin. Microb. Rev. 25: 125-144.
- 2) Johnson, D. M., H. S. Sader, T. R. Fritsche, et al. 2003. Susceptibility trends of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* against orally administered antimicrobial agents: five-year report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 47: 373-376.
- 3) 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.
- 4) Saito, R., S. Nonaka, H. Nishiyama, et al. 2012. Molecular mechanism of macrolide-lincosamide resistance in *Moraxella catarrhalis*. J. Med. Microbiol. 61: 1435-1438.
- 5) 山田景土, 柏真知子, 風間春子, 他. 2013. 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. 日臨技誌 23: 95-101.
- 6) Leclercq, R., P. Courvalin. 1998. Streptogramins: an answer to antibiotic resistance in Gram-positive bacteria. Lancet 352: 591-592.
- 7) 松岡真由美, 中島良徳. 1999. マクロライド系薬剤の耐性機構—臨床分離細菌を中心に. 医学のあゆみ 191 (11): 1041-1045.
- 8) Chironna, M., A. Sallustio, S. Esposito, et al. 2011. Emergence of macrolide-resistant strains during an outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* infections in children. J Antimicrob Chemother 66: 734-737.
- 9) Chisholm, S. A., J. Dave, C. A. Ison. 2010. High-level azithromycin resistance occurs in *Neisseria gonorrhoeae* as a result of a single point mutation in the 23S rRNA genes. Antimicrob Agents Chemother 54: 3812-3816.
- 10) Li, B. B., C. M. Wu, Y. Wang, et al. 2011. Single and dual mutations at positions 2058, 2503 and 2504 of 23S rRNA and their relationship to resistance to antibiotics that target the large ribosomal subunit. J Antimicrob Chemother 66: 1983-1986.
- 11) 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.
- 12) Laukeland, H., K. Bergh, L. Bevanger. 2002. Posttraumatic endoophthalmitis caused by *Moraxella nonliquefaciens*. J. Clin. Microbiol. 40: 2668-2770.
- 13) Hana, Y., D. Yong, K. Lee, et al. 2014. Profiling bacterial community in upper respiratory tracts. BMC Infect. Dis. 14: 583-592.
- 14) Nonaka, S., K. Matsuzaki, T. Kazama, et al. 2013. Antimicrobial susceptibility and mechanism of high-level macrolide resistance in clinical isolates of *Moraxella nonliquefaciens*. J. Med. Microbiol. 63: 242-247.
- 15) Ferroni, A., I. Sermet-Gaudelus, E. Abachin, et al. 2002. Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center. J. Clin. Microbiol. 40: 3793-3797.
- 16) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Methods of antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline, 2nd ed. M45-A2, CLSI, Wayne, PA.
- 17) Sechi, LA, S Zanetti, I Dupré, et al. 1998. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences as molecular targets for typing of *Mycobacterium tuberculosis strains*. J Clin Microbiol 36: 128-132.
- 18) Suzuki, S, T. Yamazaki, M. Narita, et al. 2006. Clinical evaluation of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 50: 709-712.

Genome analysis of *Moraxella catarrhalis* and *Moraxella nonliquefaciens* exhibiting high resistance to macrolides, isolated from pediatric clinical specimens at a medical institution in Akita Prefecture, Japan

Keiko Sato¹⁾, Jun Yatuyanagi²⁾, Gene Igawa³⁾, Ryoichi Saito³⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Akita Red Cross Hospital

²⁾Department of Bacteriology, Akita Prefectural Institute of Public Health

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

Moraxella catarrhalis is a causative agent of upper or lower respiratory inflammation and otitis media in children. In contrast, *Moraxella nonliquefaciens* is a normal inhabitant of the upper respiratory tract and is considered minimally pathogenic. However, it is isolated at a high rate from the upper respiratory tract of children with viral infections, and its genome reportedly contains genes encoding proteins involved in pathogenicity. In the present study, we investigated the resistance mechanism of *M. catarrhalis* and *M. nonliquefaciens* strains with high resistance to macrolides that were isolated from pediatric clinical specimens at a medical institution in Akita prefecture, Japan. All three isolated strains of *M. catarrhalis* had an A2058T mutation in Alleles 1 to 4 of the 23S rRNA gene. All three strains of *M. nonliquefaciens* also had an A2058T mutation in the 23S rRNA gene. None of the 6 strains had *ermA*, *ermB*, *ermC*, or *mefA* genes. Those results suggest that *M. catarrhalis* and *M. nonliquefaciens*, which acquired high resistance to macrolides via an A2058T mutation in the 23S rRNA gene, are prevalent in Japan. It is necessary to establish nation-wide surveillance system for monitoring prevalence of both these macrolide-resistant species in Japan.