

資 料

山形県におけるマイコプラズマ感染症の分子疫学的検討

青木 敏也, 金子 紀子, 大谷 勝実

Molecular Epidemiological Examination of *Mycoplasma pneumoniae* Infections in Yamagata Prefecture Based on PCR-RFLP of P1 Cytadhesin Gene

by Toshiya AOKI, Akiko KANEKO and Katsumi OOTANI

2003年10月から2007年3月にかけて県内の患者から分離した*Mycoplasma pneumoniae* 63株のP1細胞附着蛋白質遺伝子をPCR-RFLPで型別した。その結果を基に本県のマイコプラズマ感染症を分子疫学的に検討した。63株の遺伝子型はI型が57株、II型が6株でII型はすべてII型亜型であった。それぞれに3つと5つのサブタイプが確認され、その中で1aが31株、1cが25株であり、この2つが本県の主要サブタイプと思われた。1aと1cの検出数の年次推移をみると、何らかの周期性の存在が示唆された。年次別地理的分布では、村山地域において優勢なサブタイプが2～3年周期で入れ替わる様な現象が確認された。2004年は村山地域と置賜地域で優勢なサブタイプが異なっており、流行した菌の違いが認められた。置賜地域では県内で最も多い1aが検出されておらず、サブタイプの分布に地域的な偏りが認められた。同一地域内において地域的な流行の他に、別の菌によるスポット的な小さな流行の存在も覗かれた。

Key Words : *Mycoplasma pneumoniae*, P1遺伝子型, PCR-RFLP, 分子疫学

I はじめに

ヒトのマイコプラズマ感染症の主な起因菌は*Mycoplasma pneumoniae* (*M.p*)で、上気道炎、気管支炎、肺炎などの呼吸器感染症を引き起こす¹⁾。

*M.p*はヒトに経気道的に侵入し、気道線毛上皮細胞に附着する。この附着性の中心的な役割を担うのがP1細胞附着蛋白質(P1)といわれている²⁾。P1は、それをコードする遺伝子に多型がみられるため、*M.p*の遺伝子型別に用いられている³⁾。現在、その型はI型菌とII型菌の2つが知られているが、Dorigo-Zetnmaらは*M.p* 21臨床分離株の遺伝子型別を行った結果、I型菌とII型菌が、それぞれ5つと3つのサブタイプに分類されたことを記載した³⁾。

当所では2003年より臨床検体を対象に*M.p*分離培養検査、PCR法による*M.p*遺伝子検査を行なっている。そこで今回、Dorigo-Zetnmaらが記載した方法を参考に当所で分離した*M.p*株の遺伝子型別を試みた。その結果を基に本県における*M.p*感染症の菌側から見た流行の特徴を分子疫学的に検討した。

II 材料と方法

1) 材料

2003年10月から2007年3月までに県内の医療機関に

おいて、マイコプラズマ感染症疑いの患者から採取された咽頭スワブ419検体を材料とした。咽頭スワブをPPLO液体培地2ml中に丹念に絞り出し、その液体培地を検査に用いた。

2) PCR法

上記の液体培地0.2mlをPPLO二層培地に接種して37℃で培養した。2～4週後、PPLO二層培地の液体部分を1ml採取し、遠心(12,000rpm20分)、沈渣にSTE緩衝液0.1mlを加えた後、100℃10分加熱、されに遠心(12,000rpm10分)して、その上清をテンプレートDNAとした。次に、Ievenらが記載した方法により、*M.p*の16S rRNAおよびP1遺伝子を標的としてPCRを行なった⁴⁾。

3) 分離培養およびコロニーのクローニング

PCR陽性検体について*M.p*の分離培養を行なった²⁾。でテンプレートDNAを作成した残りの二層培地の液体部分0.1mlをPPLO分離平板培地に接種し37℃で培養してコロニーを形成させた。目玉焼き状の特徴的なコロニーが形成された場合、注射針でコロニーを周辺の培地ごと削り取り、PPLO増菌培養液に加え37℃でクローニングした。

4) P1遺伝子型別

PCR-RFLPによるP1遺伝子型別を下記により行なった。3)のPPLO増菌培養液の色が赤から黄に変わった時点で、その1mlを採取し1)と同様にテンプレートDNAを

調整した。遺伝子型別はSasakiらの方法により、P1遺伝子の前半部と後半部を、それぞれADH1 (5'-CTGCC TTGTCCAAGTCCACT-3')・ADH2(5'-AACCTTGTCTGGG AA GAGGTG-3') およびADH3(5'-CGAGTTTGTCTGCTA ACGAG T-3')・ADH4(5'-CTTGACTGATACCTGTGCGG-3')のプライマーセットで増幅、増幅産物を制限酵素Hae IIIで消化後、RFLPパターンを観察した⁵⁾。遺伝子型はP1遺伝子前半部および後半部ともにI型パターンを示す菌をI型、同様にII型パターンを示す菌をII型とし、前半部はII型パターンで、後半部がII型と若干異なるパターンの菌をII型亜型 (II'型) と分類した¹⁾。次に、Dorigo-Zetnmaらの方法を用いて各遺伝子型のサブタイピングを行なった³⁾。プライマーセットADH1・ADH2の増幅産物を制限酵素Hpa IIで、プライマーセットADH3・ADH4の増幅産物をHha IおよびSau 3A Iでそれぞれ消化後、RFLPパターンを観察した。それぞれのRFLPパターンを組み合わせ各遺伝子型のサブタイプに分類した。

III 結 果

1) 検査状況

2003年10月から2007年3月までの検査状況を図1、2に示した。検体数は秋から早春(9月から3月)に増加した。PCR陽性数、菌分離数ともに冬期間が多かった。年齢別では、検体数は5-9才をピークに1才から14才が多く、全体の93%(391/419)を占めた。5-9才がPCR陽性率(29%:50/174)、菌分離率(27%:47/174)とも

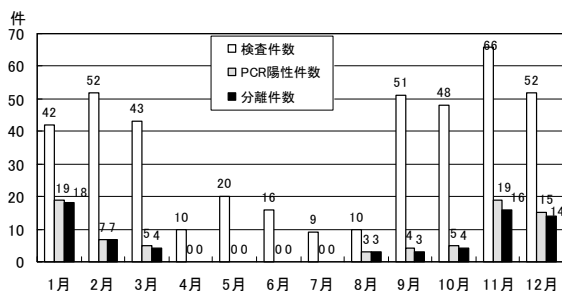


図1 月別検査状況

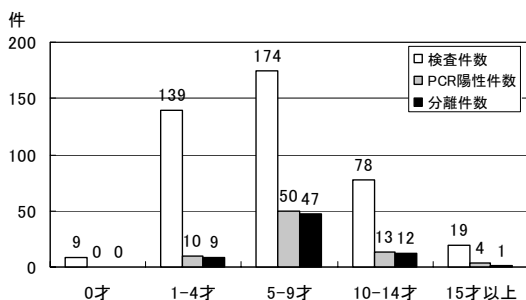


図2 年齢別検査状況

に高かった。

全体では検体419件中77件(18%)がPCR陽性で、これら77件中69件(90%)から菌が分離された。全検体中での菌分離率は16%であった。菌が分離された69株の内の63株をP1遺伝子型別およびサブタイピングに供試した。

2) P1遺伝子型別

図3にM.p臨床分離株63株のHae IIIによるRFLPパターンを示した。P1遺伝子型はI型が57株(90%)、II型が6株(10%)であり、II型はすべてII'型であった。

3) P1遺伝子型のサブタイピング

各制限酵素によるRFLPパターンを図4に示した。P1遺伝子の前半部の増幅断片は、Hpa IIによって5つのパターンに分けられた。P1遺伝子の後半部の増幅断片は、Hha IとSau 3A Iによって、それぞれ2つと3つのパターンに分けられた。各制限酵素によるRFLPパターンを組み合わせ、P1遺伝子I型およびII'型のサブタイピングを行なった。

表1にP1遺伝子のサブタイプとその菌株数を示した。P1遺伝子I型は1a, 1b, 1cの3つのサブタイプに分類された。P1遺伝子II'型は2a, 2b, 2c, 2d, 2eの5つのサブタイプに分類された。県内の患者から分離された63のM.p臨床分離株は、P1遺伝子のPCR-RFLPによって2つの遺伝子型と8つのサブタイプに分類された。最も検出頻度が高かったのは1aの31株(49%)で、次が1cの25株(40%)であり、この2つの型が全体の89%を占めた。

4) 年次別P1サブタイプ検出状況

図5にP1サブタイプの検出数を年次別に示した。2003年から2007年までの5年間では、毎年I型が多く検出され、サブタイプ別では各年次において1aあるいは

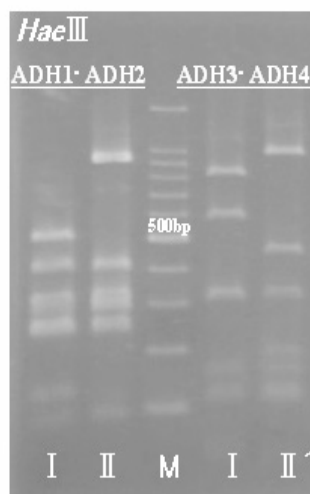


図3 Hae IIIによるRFLPパターン

1cが多く検出された。1bが検出されたのは2004年のみであった。Ⅱ'型サブタイプは2004年, 2005年, 2007年に検出された。中でも2004年には3種類4株検出された。Ⅱ'型では優勢なサブタイプは認められず, 検出されたサブタイプは年ごとに異なった。

I型の主要サブタイプ1a, 1cに注目すると, 1aは2004年, 2007年に検出数が多く, 1cは2004年~2006年に多く検出された。1aと1cの検出数の比較では, 2005年と2007年に優勢なサブタイプが入れ替わった(図6)。

5) P1サブタイプの地理的分布

図7にP1サブタイプの地理的分布を年次別に示した。5年間の地域別の*M.p*検出数は, 村山地域が52株, 置賜地域が9株, 庄内地域が2株であった。最も検出数の多い村山地域では52株中1aが30株(58%), 1cが17株(33%)であり, 優勢なサブタイプは2003年, 2004年が1a, 2005年, 2006年が1cで, 2007年は1aに戻った。一方, 置賜地域では, 1cが7株, 1bが1株であり, 1aは検出されなかった。Ⅱ型6株は村山地域で5株, 置賜地域で1株検出された。山形市では5年間で6種類のサブタイプが確認された。

IV 考 察

当所で分離した*M.p* 63株のP1遺伝子型はI型が57株(90%), Ⅱ'型が6株(10%)であった。全国の状況を見ても, 最近の数期間はI型が優勢で, Ⅱ型のほとんどがⅡ'型であり¹⁾本県と一致している。日本においてI型とⅡ型は8から10年周期で交互に入れ替わることが知られている¹⁾。この様な現象の正確な原因は不明だが, P1遺伝子型に対するヒトの防御免疫が関与していると推測されている¹⁾。

M.p 63株のP1遺伝子型サブタイピングの結果から, 1aと1cが本県における主要サブタイプと考えられた。一方, 今回確認されたI型3つ, Ⅱ'型5つ合計8つのサブタイプの内, 1b, 2a, 2b, 2d, 2eの5つはDorigo-Zetnmaらが記載した8つのサブタイプ以外のもので

あった。また, Dorigo-Zetnmaらが記載した中の5つは, 我々が確認した以外のサブタイプであった。このことから, 今回13種類のP1遺伝子型サブタイプの存在が明らかになった。今後その数は増加することが示唆される。

I型に注目し, その主要なサブタイプである1a, 1cの検出数の年次推移をみると, 周期性がある様に思われる。それが, 1aと1cのそれぞれが単独に異なる周期で増減しているのか, あるいは遺伝子型の定期的な入れ替

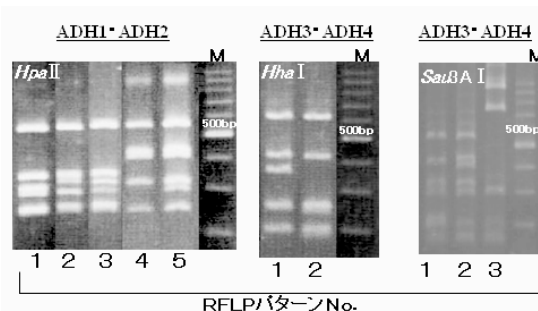


図4 *Hpa* II, *Hha* Iおよび*Sau* 3A IによるRFLPパターン

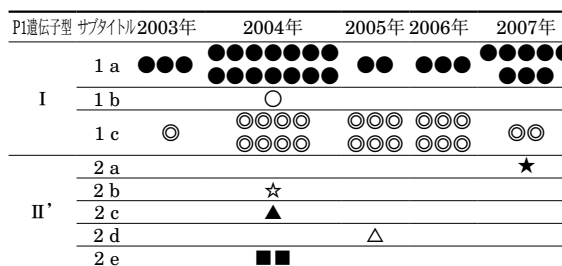


図5 年次別P1サブタイプの検出状況

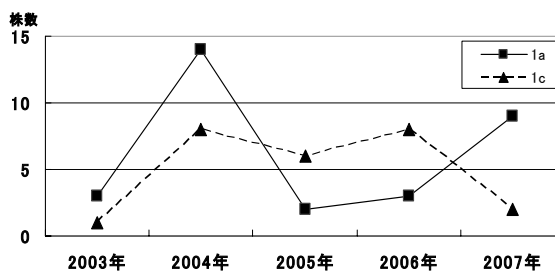


図6 I型主要サブタイプにおける検出数の年次推移

表1 P1遺伝子型のサブタイピング

P1遺伝子型	PRC-RFLPパターンNo.			P1遺伝子型サブタイプ	菌株数
	(ADH1-ADH2)	(ADH3-ADH4)			
	<i>Hpa</i> II	<i>Hha</i> I	<i>Sau</i> 3A I		
I	1	1	1	1a	31
	2	1	1	1b	1
	3	1	1	1c	25
Ⅱ'	4	1	3	2a	1
	4	2	2	2b	1
	5	1	1	2c	1
	5	1	3	2d	1
	5	2	2	2e	2

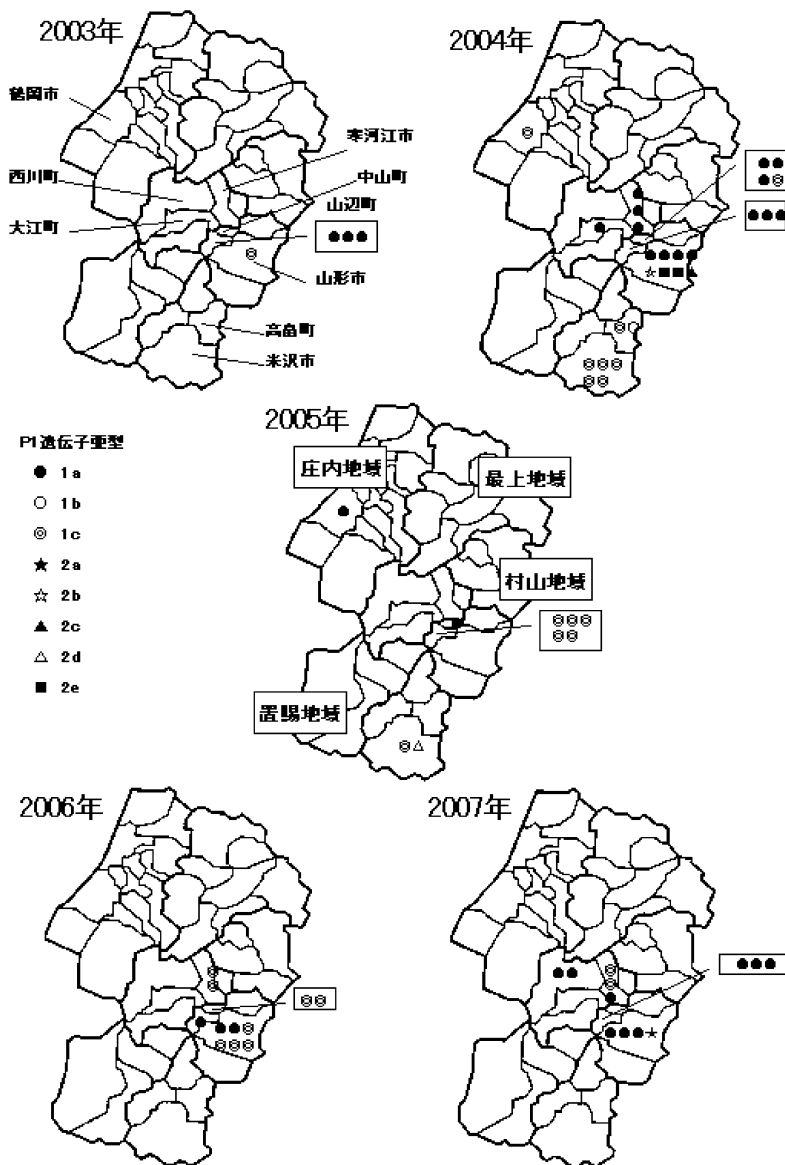


図7 P1サブタイプの年次別地理的分布

わりのように、I型内でも遺伝子型よりは短い周期でサブタイプ間の相の入れ替わりが起きているのか、今後調べる必要があるものと思われる。

年次別地域的分布をみると、村山地域では2～3年間の優勢なサブタイプの入れ替わりが観察された。この現象には周期性の存在が示唆された。2004年は村山地域で1aが主流なのに対して置賜地域では1cが多く、同一年次においても流行しているM.pは地域的に異なる現象が認められた。2006年に村山地域では1cの流行の中で1aが3株確認された。詳しくみるとこの3名の居住地は隣接しており、同一地域内で地域的な流行の他に、それとは別のM.pによるスポット的な小さな流行も存在

することが覗かれた。置賜地域からは本県で最も主要な1aが確認されていないことから、この地域での継続的なサンプリングが必要と思われた。山形市では6種類のサブタイプが確認された。このことは、山形市が県内外からの人の出入りが頻繁なため、他の地域から持ち込まれたM.pの混在の可能性が考えられた。

最後に、今回対象となった419検体の80%が村山地域内の1医療機関で採取されたものであり、サンプリングに偏りがあるため、本県の状況を正確に反映しているかという問題はある。しかし、患者報告数の約80%が村山地域からのものであること²⁾、前述の検査状況でも示したように、M.pの月別分離状況、分離された患者の年

齢分布は本県の発生状況とほぼ一致しており²⁾、このデータは県内の実態と大幅には乖離していないものと考えられる。今回の結果から、今後さらにデータを集積・解析していけば、将来県内各地域で流行する*M.p*の予測がある程度可能になるものと思われた。

文 献

- 1) 国立感染症研究所情報センター：病原微生物検出情報 28, 2007 31-43
- 2) 山形県感染症情報センター：山形県感染症発生動向調査事業報告書 2005, 50-87
- 3) J.Wendelien Dorigo-Zetsma, Jacob Dankert, and Sebastian A.J.Zaat : Genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* Clinical Isolates Reveals Eight P1 Subtypes within Two Genomic Groups. J.Clin Microbiol. 38, 965-970, 2000
- 4) M.Ieven, D.Ursi, H.Ban Bever, W.Qint, H.G.M. Niesters, et. al : Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by Two Polymerase Chain Reactions and Role of *M.pneumoniae* in Acute Respiratory Tract Infection in Pediatric Patients. J.Infect. Dis. 173, 1445-1452, 1996
- 5) T.Sasaki, T.Kenri, N.Okazaki, M.Iseki, and R.-Yamashita, et. al : Epidemiological Study of *Mycoplasma Pneumoniae* Infections in Japan Based on PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of the P1 Cytadhesin Gene. J.Clin.Microbiol. 34, 447-449, 1996