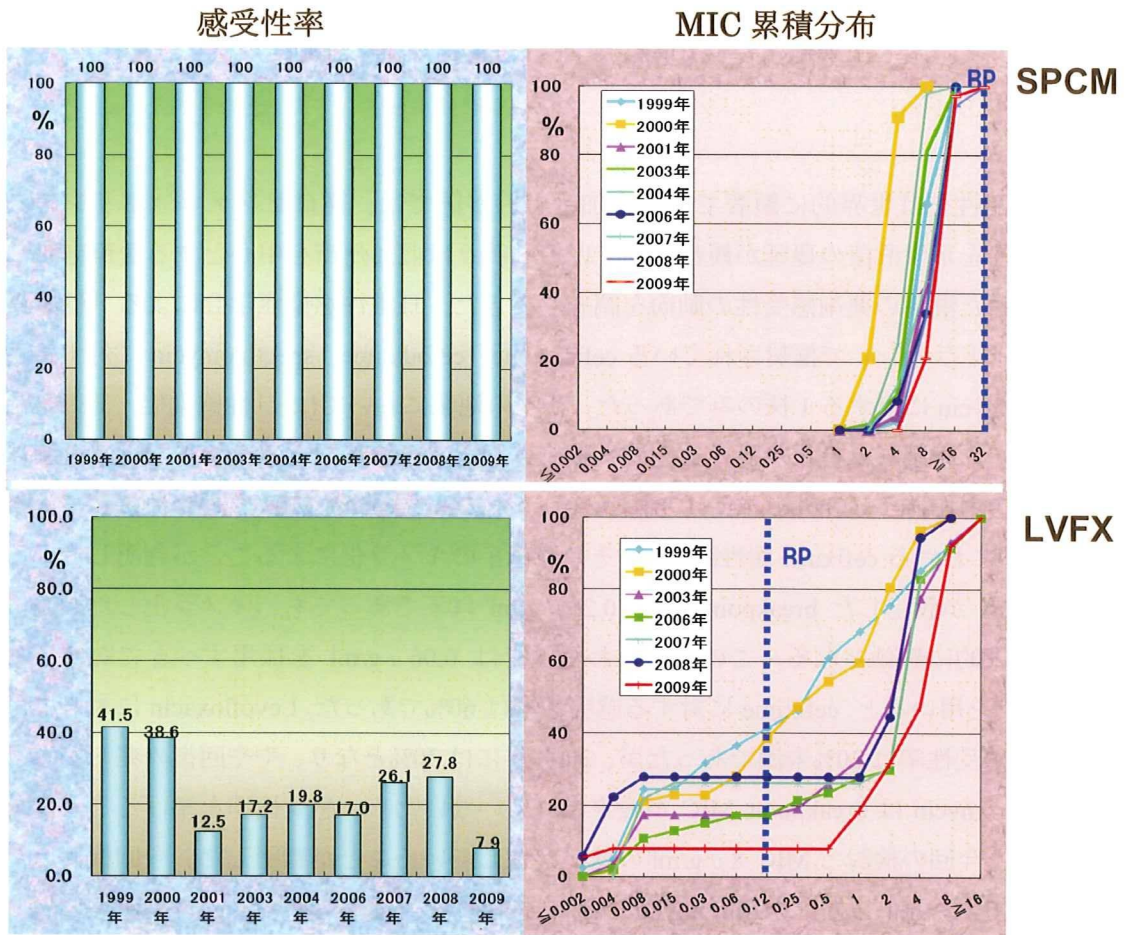


(图 4)



厚生労働科学研究費補助金 (性感染症に関する予防、治療の体系化に関する研究事業)

(21年度総括・分担) 研究報告書

淋菌、クラミジアの薬剤感受性に関する研究

淋菌および非淋菌における咽頭感染の実態調査

研究分担者 松本哲朗 産業医科大学医学部泌尿器科 教授

濱砂良一 産業医科大学医学部泌尿器科 講師

研究要旨

淋菌の薬剤耐性化は世界的に顕著である。加えてわが国では、経口セファロスポリンである cefixime に耐性を示す淋菌の蔓延が観察されている。我々は北九州市を中心とする医療施設において、検出された淋菌の薬剤感受性の動向を調査してきた。日本性感染症学会による「性感染症診断・治療ガイドライン」で推奨されている ceftriaxone、cefodizime、spectinomycin に対する耐性菌は、spectinomycin に対する 1 株のみであった。我々の地域においては、「性感染症 診断・治療ガイドライン」の推奨薬は有用であることが、検証された。経口セフェム薬の中では、淋菌に対し最も強い抗菌力を持つ cefixime に対する感受性は、その breakpoint MIC の設定によって大きく異なる。わが国における cefixime 耐性淋菌は、その遺伝子のキメラ化によることが判明している。このため、CLSI が設定した breakpoint MIC $0.25 \mu\text{g/ml}$ 以下であっても、キメラ化した淋菌には cefixime は臨床的に無効となる。このため、わが国では $0.06 \mu\text{g/ml}$ を採用すべきであり、この breakpoint MIC を用いると、cefixime に対する感受性率は 60%であった。Levofloxacin に対しては、2002 年以降、感受性率は 20%未満であったが、2008 年には 30%となり、やや回復の兆しがみうけられた。Azithromycin は breakpoint MIC が設定されていないため、感受性率を挙げることはできない。しかし、今回の検討で MIC $8 \mu\text{g/ml}$ の株が存在していることが判明した。今回検討した淋菌の MIC₉₀ は $0.5 \mu\text{g/ml}$ であり、Azithromycin 2g の体内動体を考慮しても、 $8 \mu\text{g/ml}$ は耐性に属し、わが国にはすでに azithromycin 耐性株が存在することが明らかとなった。

女性の咽頭における淋菌、クラミジアが、性感染症(STI)の蔓延の一因となっている。しかし、男性咽頭における STI 病原体における検討は非常に少ない。ホモセクシュアル男性において、淋菌が咽頭から検出されるという海外の報告は多い。しかし、ヘテロセクシュアルの男性の咽頭に、STI 起炎菌が感染または保菌する可能性があるかを検討する必要がある。今回、わが国でこれまでに報告または発表された、男性咽頭における淋菌、クラミジアの保菌に関する 8 つの研究を検討した。淋菌では尿道炎をもつ 780 名の男性のうち、144 名の咽頭から分離されており、18.5%の検出率であった。クラミジアは尿道炎をもつ 752 名の男性のうち、45 名より分離され、6.0%の検出率であった。尿道炎を有する男性から、淋菌、クラミジアが比較的高い確率で検出されることがわかってきた。さらに非淋菌性尿道炎の起炎菌を含めた検討が必要である。

A. 研究目的

淋菌の薬剤耐性化は世界的に顕著である。加えてわが国では、経口セファロスポリンの中で、淋菌に最も強い抗菌力を有する cefixime に耐性を示す淋菌の蔓延が観察されている。我々は北九州市を中心とする地域において、淋菌の薬剤感受性の推移を観察してきた。同一地域において淋菌の薬剤感受性の観察は、日本性感染症学会による「性感染症 診断・治療ガイドライン」による推奨薬の有用性を検証するために重要である。また、わが国で淋菌性尿道炎に保険適用となっている azithromycin は、世界各地においてその耐性化が問題となっている。わが国発売された azithromycin 2g 製剤の有用性を検証することも本研究の目的のひとつである。

また、女性の咽頭における淋菌、クラミジアの感染が性感染症 (STI) の蔓延の一因となっている。しかし、男性咽頭における STI 病原体における検討は非常に少ない。ホモセクシュアル男性においては、特に淋菌が S 咽頭から検出されという多数の報告が、海外からなされている。これは、ホモセクシュアルの男性では、女性同様、オーラルセックスにより咽頭に感染することは想像しやすい。しかし、へ

テロセクシュアルの男性の咽頭に、STI 起炎菌が感染または保菌するということは、検討する必要がある。我々のこれまでの検討では、淋菌、クラミジアとも男性咽頭からの検出が認められている。この男性咽頭における STI 起炎菌の実態調査を行い、感染経路や行動様式を明らかにすることが本研究のもうひとつの目的である。

B. 研究方法

北九州、山口地区において、生殖器または咽頭より分離された淋菌の薬剤感受性を検討した。対象薬剤は、「性感染症 診断・治療ガイドライン」で推奨されている ceftriaxone、cefodizime、spectinomycin のほか、penicillin G、経口セフェムとして cefdinir と cefixime、tetracycline、levofloxacin、azithromycin とした。これらの年次推移による感受性の変化を観察した。

男性咽頭における STI 起炎菌の保菌の実態を知るため、まず、淋菌、クラミジアに関してこれまでに小規模ながら集積された各地の検討データを集積した。論文化されたもののほか、学術集会での報告、地方における報告会でのデータを譲り受け、検討を行った。

C. 研究結果

淋菌の薬剤感受性は北九州・山口地区で1999年から2008年までに集められた2151株を対象とした。淋菌の報告数は2002～2004年をピークに著明に減少していた。「性感染症 診断・治療ガイドライン」で推奨されている ceftriaxone、cefodizime、spectinomycin に対しては、現在まで大きな変動はない。spectinomycin 耐性の1株のみがこの10年間で観察された上記3剤に対する耐性菌であり、北九州地区において、この耐性菌の蔓延は認められなかった。Penicillin G に対しての感受性率は10%以下で推移し、回復の兆しはなかった。経口セフェムである cefdinir に対する感受性率は60%前後であり、変化はなかった。cefixime に対しては、Breakpoint 設定により大きな差があった。CLSI が設定した breakpoint MIC ($0.25 \mu\text{g/ml}$) を用いると、感受性率は90-98%となる。しかし、Deguchi らが報告したように、わが国において、breakpoint MIC は $0.06 \mu\text{g/ml}$ を採用すべきである。これはキメラ化した淋菌では、臨床的に cefixime は無効であり、キメラ化した淋菌の MIC はすべてを $0.06 \mu\text{g/ml}$ 以上であったことに基づく。この breakpoint MIC を

用いると、感受性率は60%であった。Levofloxacin に対しては、2002年以降、感受性率は20%未満であったが、2008年には30%となり、やや回復の兆しがあった。Azithromycin は breakpoint MIC が設定されていないため、感受性率を挙げることはできないが、今回の検討で MIC $8 \mu\text{g/ml}$ の株が存在していたことが判明した。すべての株に対する azithromycin の MIC₉₀ は $0.5 \mu\text{g/ml}$ であった。Azithromycin 2g の体内動態を考慮した場合、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ までは到達可能であろうが、 $8 \mu\text{g/ml}$ には達しないことが推定される。これらを考慮すると、わが国にはすでに azithromycin 耐性株が存在することは明らかである。

男性咽頭における淋菌、クラミジアの保菌に関する検討は、8つの検討がなされていた。これらはすべて尿道炎をもつ男性患者に対する検討であった。淋菌では780名の男性患者のうち、144名の咽頭から分離されており、18.5%の検出率であった。クラミジアは752名の男性患者のうち、45名より分離され、6.0%の検出率であった。

D. 考察

淋菌の薬剤感受性の推移を検討した。まず、「性感染症 診

断・治療ガイドライン」における推奨薬に対して、我々の地区では耐性化は進んでいなかった。しかし、近年、ceftriaxoneに対する低感受性、耐性株の報告が散見されるため、今後の推移を見守る必要がある。Azithromycinに対する耐性傾向があることが、今回の調査で明らかとなった。ヨーロッパからの報告では、MIC 8 μ g/ml は高度耐性の範疇に入る。わが国状況は、英国の Scotland における状況に非常に似ている。英国では淋菌に対して azithromycin が推奨された後、azithromycin 高度耐性菌が 0.3% 検出された。しかし、その後対策をとらなかつた結果、3年後には 3.9% となったことが示されている。我々の地区においても、現在耐性率は 0.5% であり、今後の azithromycin 耐性の動向を見守っていく必要がある。また、わが国において AZM 2g が有用であるかという臨床試験を行う必要がある。

男子咽頭への STI 起炎菌の保菌に関しては、当初、約 500 名を目標とした研究計画を立てていた。しかし、淋菌、クラミジアに関しては、これまでの研究、また、現在進行中の研究を合わせると約 1000 名に達する検討がなされてきたことになる。特

に淋菌に関しては、ヘテロセクシュアルの男性においても、咽頭に保菌することはほぼ明らかである。このため、これらの STI 起炎菌が保菌であるか、感染であるかを立証することが必要になると考えて、計画を立て直す必要が出てきた。さらに、淋菌、クラミジア以外の起炎菌を研究する必要性は依然として残っているため、今後実施していくことを計画している。

E. 結論

F. 研究発表

学会発表

Sho T., Muratani T., Kobayashi T., Goto R., Tatsumoto T.: Antimicrobial susceptibility of various antibiotic against *Neisseria gonorrhoeae* isolates in western part of Japan. 18th International society of Sexually transmitted Diseases and Research, 2009.6.8-7.1, London, UK

Hamasuna R., Sho T., Muratani T., Matsumoto T.: The Japanese guideline for gonococcal infections. International Collaboration on Gonococci Workshop 2009, 2009.7.2, London. UK

淋菌、クラミジアの薬剤感受性に関する研究

産業医科大学 泌尿器科 濱砂良一・松本哲郎

R. Hamada

これまでの結論

淋菌性咽頭炎に対する抗菌薬の臨床的有効性の評価

Ceftriaxone 1g 単回投与は有効

Cefzidimeは複数回の投与が必要

わが国のcefixime耐性株の増加には、PBP-2におけるキメラ化が密接に関連している。Chimera PBP-2を有するcefixime耐性株はceftriaxoneに対しても低感受性を示す株が多い。わが国ではこの耐性株が40%前後を、特に咽頭からの除菌を念頭に置くと、ceftriaxone 125 mgではなく1 g単回投与が適当であると思われる。これは、さらなる耐性化防止という点から見ても有用である。

R. Hamada

研究計画（淋菌）

北九州地区の淋菌の薬剤感受性サーベイランスを今後も行い、耐性菌の出現を監視する

今回の注目点

1. Azithromycin (AZM) 2gが発売され、淋菌に保険適応となった。今後、開業医を中心に使用が増加すると考えられるため、AZMを含むマクロライド系抗菌薬の淋菌に対する感受性を監視する
2. Cefixime耐性はアジアを中心として環太平洋地区を中心に増加傾向があるため、監視が必要である

AZM 2gの淋菌性尿道炎、淋菌性咽頭炎の臨床効果を検討する。

E. Yamamoto

研究計画（クラミジア）

北九州地区のクラミジアの薬剤感受性サーベイランスを開始し、耐性菌の出現を監視する

今回の注目点

1. 尿道炎の起炎菌としてクラミジアの薬剤感受性の検討は、少ないため、北九州市におけるクラミジアの分離、培養、および薬剤感受性を開始したい。

E. Yamamoto

材料および方法

使用菌株:

1999年から2008年の間に北部九州・山口地区の医療機関を受診した患者の生殖器より分離された淋菌2151株を用いた。

薬剤感受性測定:

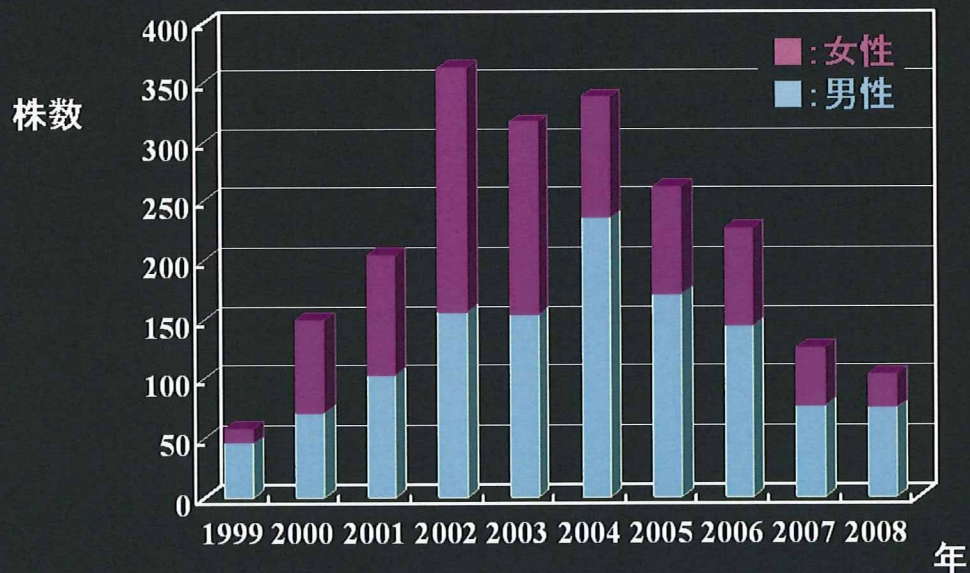
CLSIにしたがい、決められた濃度の11化合物を添加したGC寒天培地を用いた寒天平板希釈法にて実施した。

感受性率:

Breakpointは原則としてCLSIの基準にしたがったが、基準のない薬剤は、同系統で体内動態の類似した薬剤の値を使用した。

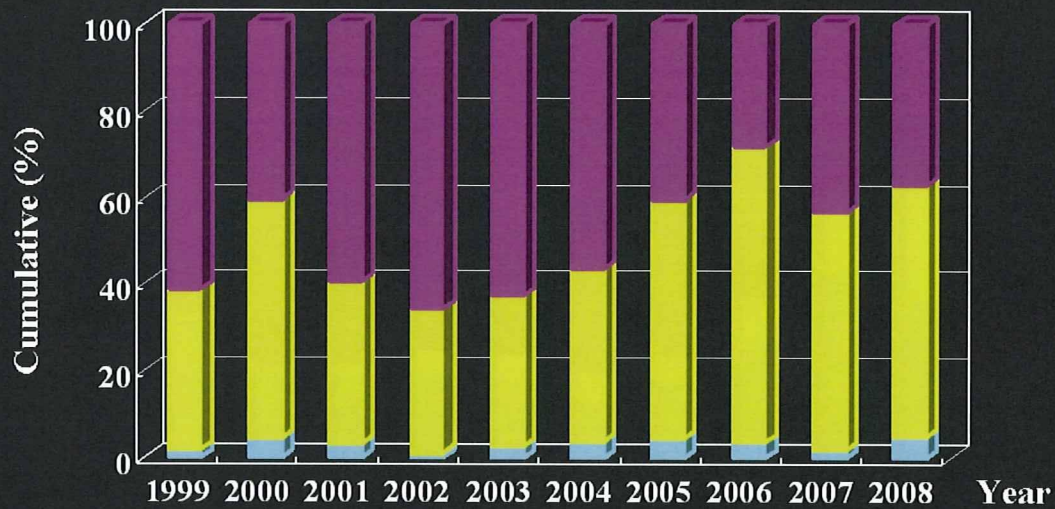
R. Hamamoto

男女別使用した菌株数



R. Hamamoto

PCGに対する*N. gonorrhoeae*の感受性の年次推移

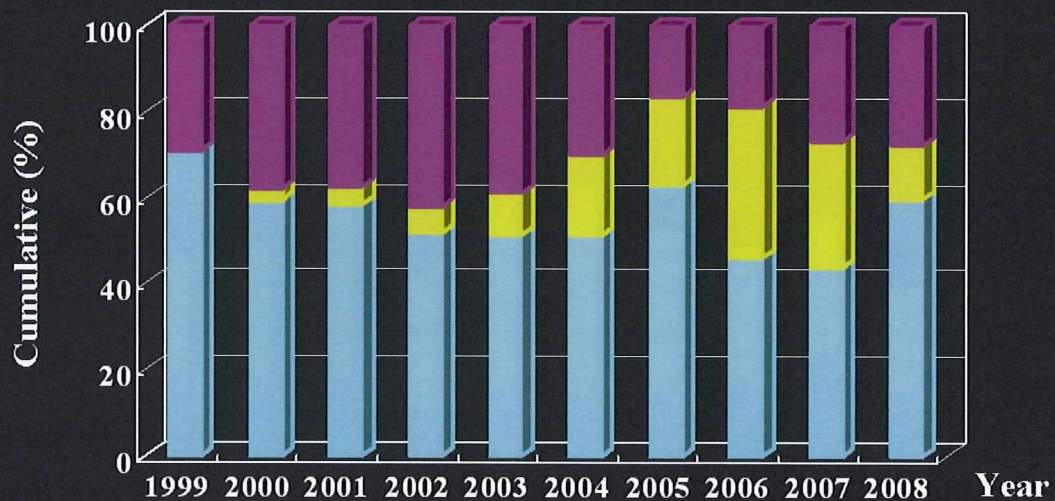


Penicillin G

■:Susceptibility (≤ 0.06), ■:Intermediate (0.12-1), ■:Resistant ($2 \leq$)

S. Hamamoto

CFDNに対する*N. gonorrhoeae*の感受性の年次推移

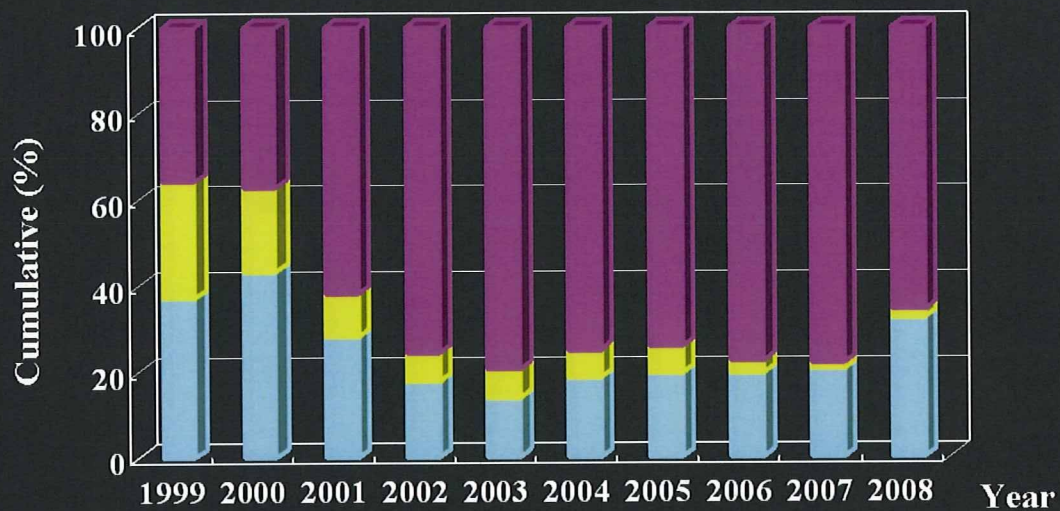


Cefdinir

■:Susceptibility (≤ 0.25), ■:Intermediate (0.5), ■:Resistant ($1 \leq$)

S. Hamamoto

LVFXに対する*N. gonorrhoeae*の感受性の年次推移

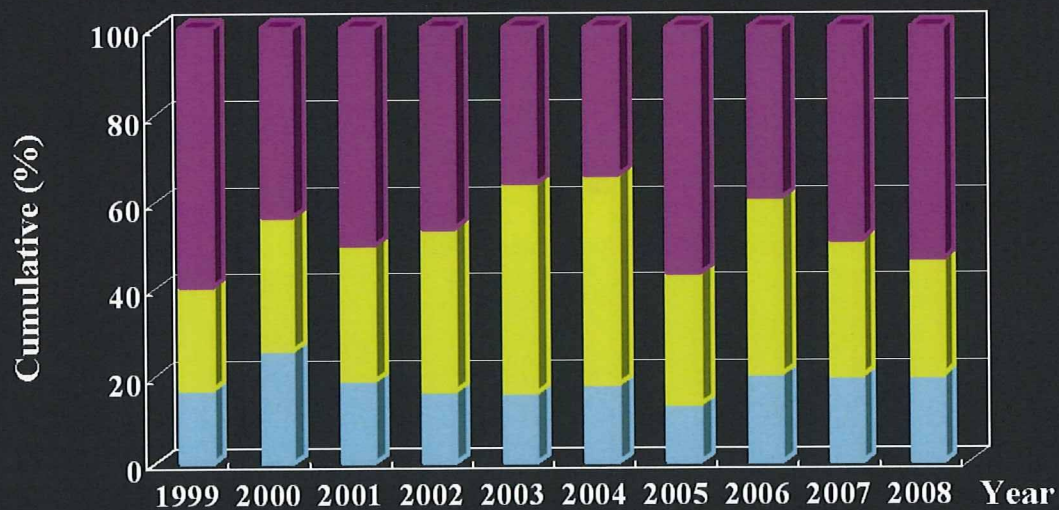


Levofloxacin

■:Susceptibility (≤ 0.25), ■:Intermediate (0.5-1), ■:Resistant ($2 \leq$)

R. Hamamoto

TTCに対する*N. gonorrhoeae*の感受性の年次推移

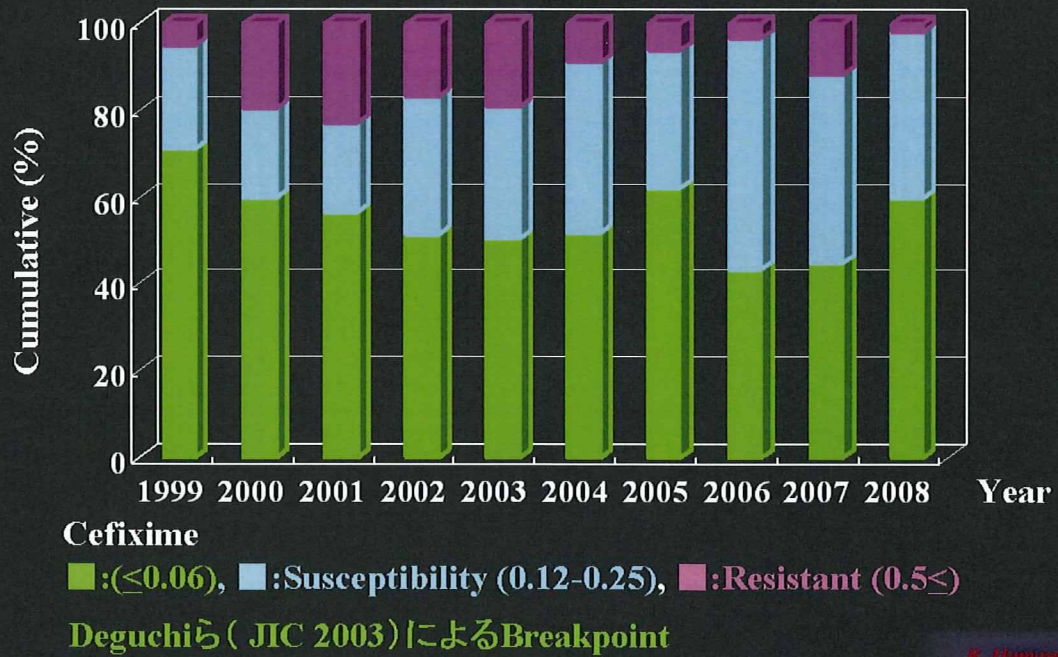


Tetracycline

■:Susceptibility (≤ 0.25), ■:Intermediate (0.5-1), ■:Resistant ($2 \leq$)

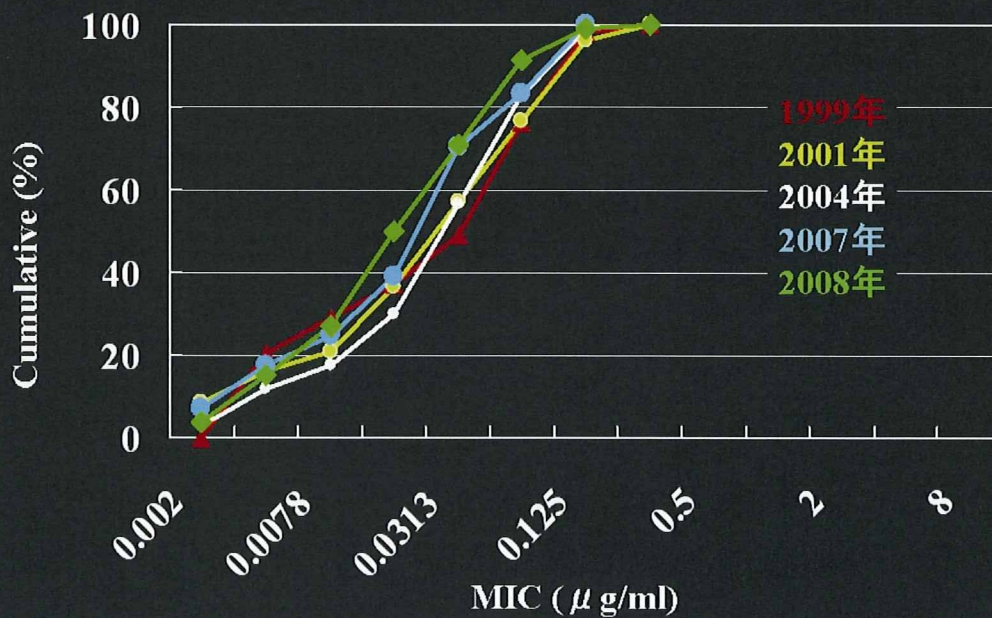
R. Hamamoto

CFIXに対する*N. gonorrhoeae*の感受性の年次推移



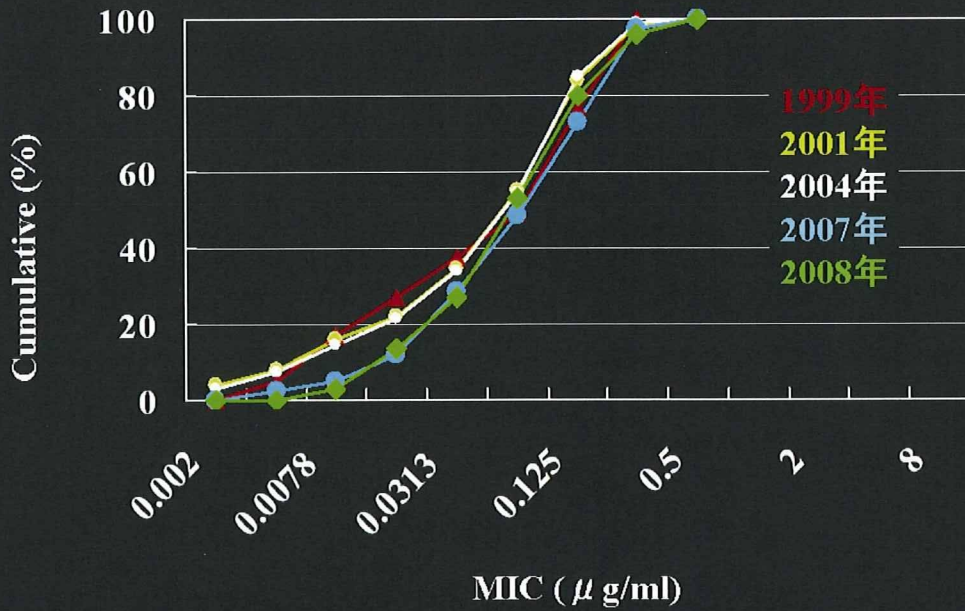
S. Humanae

CTRXの感受性分布の年次推移



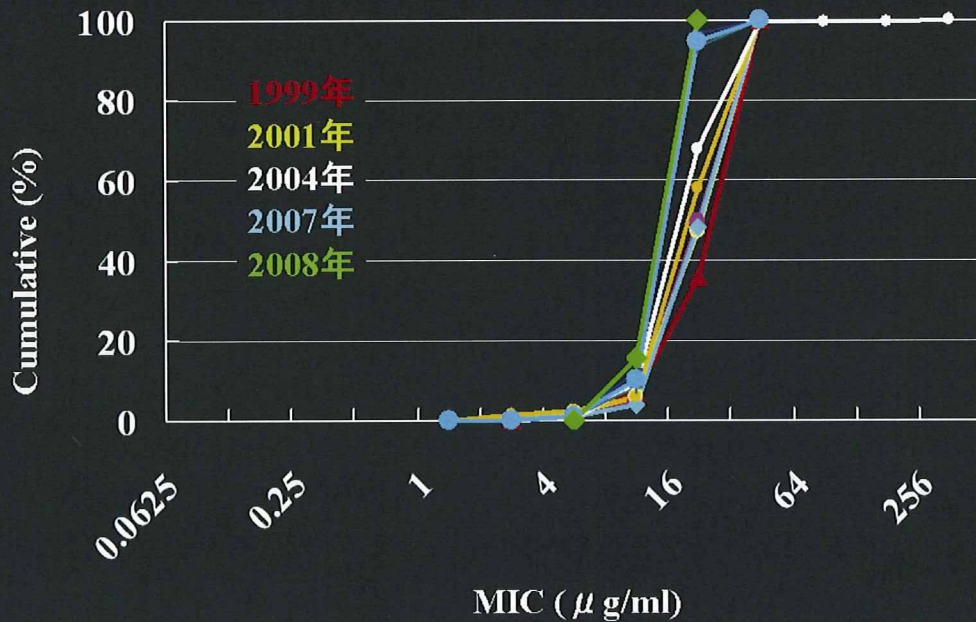
S. Humanae

CDZMの感受性分布の年次推移



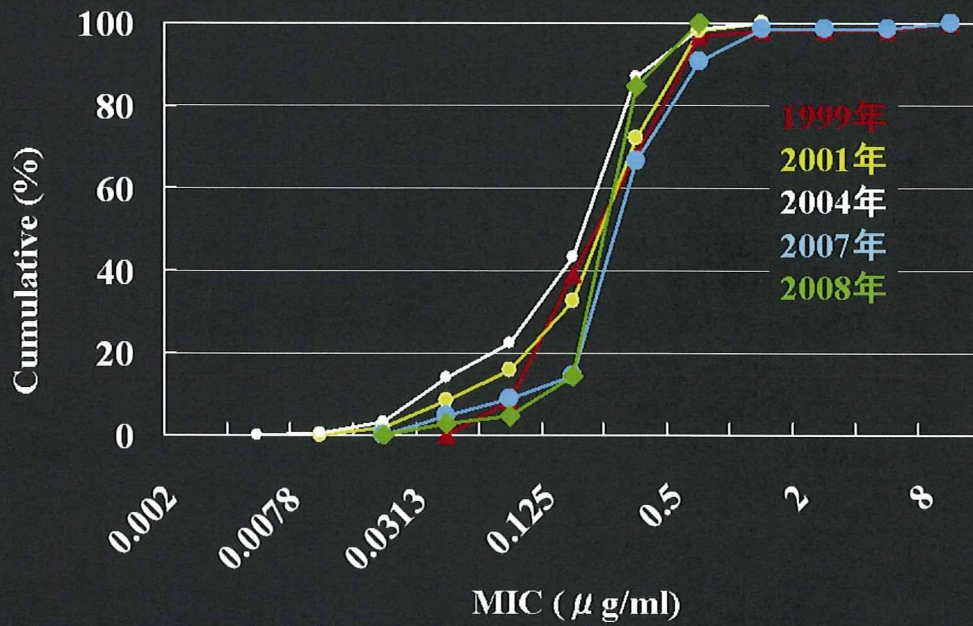
K. Hamanaka

SPCMの感受性分布の年次推移



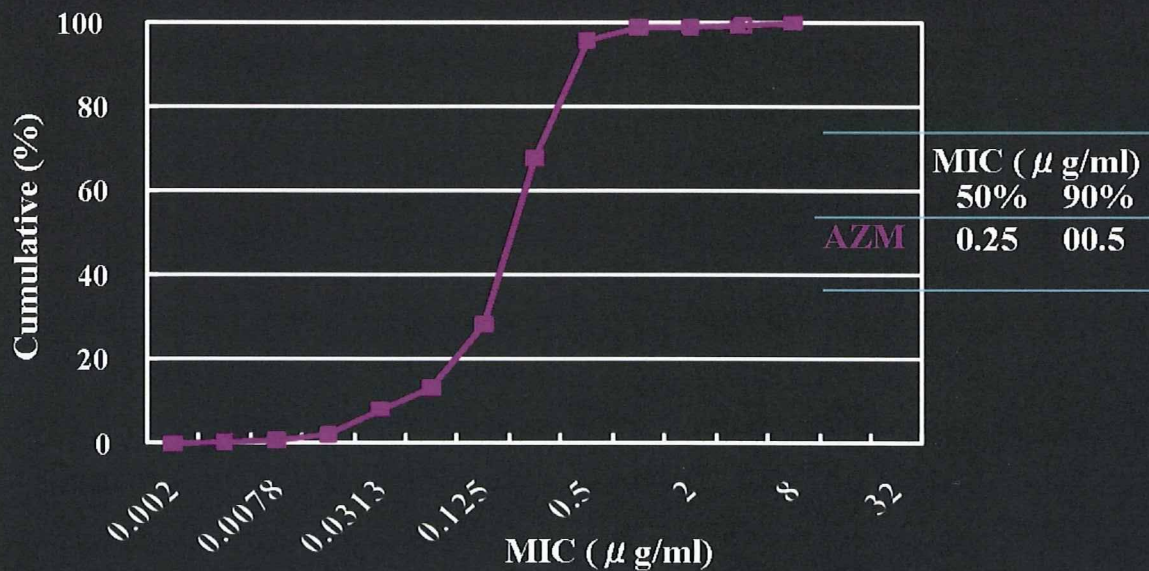
K. Hamanaka

AZMの感受性分布の年次推移



R. Hamanao

AZMの感受性分布



R. Hamanao

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

「性感染症に関する予防、治療の体系化に関する研究」
「淋菌の分子タイピングー淋菌の時間的・地理的変遷に関する研究」

研究分担者 大西 真 国立感染症研究所 細菌第一部

研究協力者 渡辺 祐子 神奈川県衛生研究所

研究要旨：

淋菌の多剤耐性化は国内のみならず、世界的に公衆衛生上の大きな問題となってきた。耐性菌の拡散機構の解明がその抑止に重要であると考えられる。そのために、淋菌の分子型別法を確立し、拡散の実態を検討することを目的とした。

1995-2005 年に神奈川県複数の施設で分離された淋菌 197 株を対象に Multi-locus sequence typing 法を用いた型別を実施した。ST7363, ST7359 および ST1901 が高頻度で認められた。ST7359 は 2001 年以降の分離は認められなかった。一方、ST7363 および ST1901 はそれぞれ 1997 年、2000 年に分離され始め、優先株の変換を示唆した。さらに、他の施設（東京）で 2000 年以降に分離された淋菌 148 株の解析からも、ST7363 および ST1901 が優先 ST 型であることが示された。これらの ST 型を示す菌株は第 3 世代経口セファロスポリン耐性を示す完全に同一な耐性遺伝子を持つことが示された。試験管内形質転換実験を利用して、耐性遺伝子の水平伝播を示唆する結果を得た。つまり、新規薬剤耐性淋菌の出現と、それに続く耐性遺伝子の水平伝播により、次々と異なる遺伝型の耐性淋菌が出現する機構の一端を明らかにした。

A. 研究目的

淋菌感染症の推定新規発生数は世界で年間 6200 万人とされる。国内での性感染症定点からの新規報告数は 1 万件程度であり、推定値としては年間 3～8 万件とされる。

淋菌感染症対策の根幹は効果的な治療に基づいた感染サイクルの遮断し、新たな感染の抑止することにある。しかしながら、近年、淋菌は多様な抗生物質に対する耐性を獲得してきている。治療に用いることができる薬剤は限定されてきており、世界的に公衆衛生上の大きな問題と認識されている。

1990 年以降 New quinolone 剤に対する耐性菌が出現し、現在国内において耐性率は 80%を超える地域があることが知られて

いる。また、1999 年には北九州市で第 3 世代経口セファロスポリン剤に対する耐性株が初めて分離され(Muratani et al., 2001)、その後日本各地で蔓延した。2000 年には東京でも、第 3 世代経口セファロスポリン剤耐性菌分離率は 10% を超え(Ameyama et al., 2002)、中部地方に於いても 2001 年には 10%を超える分離率となった (Ito et al., 2005)。現在では、アジア、欧米でもこの耐性菌が蔓延しつつある。

薬剤耐性淋菌の出現後の地域間の拡散と分離率の上昇は速やかに進んでいく傾向がある。しかしながら、分離菌株の性状解析および菌株間比較解析が十分に実施されておらず、その実態は詳細には明らかにされていない。

本研究において、関東地域で分離された菌株の系統解析を基盤として、分離菌株の経年変化について解析を行った。さらに、第3世代経口セファロスポリン剤耐性に着目し、その耐性に関与するペニシリン結合タンパク質2 (PBP 2)をコードする *penA* 遺伝子が異なる淋菌系統間で伝播している可能性を検討した。

B. 研究方法

菌株

神奈川県衛生研究所で実施されている淋菌サーベイランスで得られた菌株のうち、1995-2005年に分離された197株を解析に用いた。また、中野総合病院で2000-2008年に分離された淋菌148株についても解析を行った。

薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、寒天希釈法を用いて行った。セフェキシム耐性菌は0.25 µg/ml以上のMICを示す株とした。また、シプロフロキサシン耐性菌はMIC 1 µg/ml以上を示す株とした。

系統解析

MultiLocus Sequence Typing法を用いて淋菌株の系統解析を既報に従って行った (Jolley KA 2001)。塩基配列決定は、ABI Big Dye terminator Cycle sequencing kit version 3.1 (Applied Biosystems)を用いて行い、精製後ABI 3130 xlを用いて塩基配列の決定を行った。ST型決定は Neisseria MLST database (<http://pubmlst.org/neisseria/>)を利用して

行った。

penA 塩基配列決定

Penicillin-binding protein 2をコードする *penA* 遺伝子配列および *penA* 遺伝子周辺遺伝子の決定は、Table 1に記載したプライマーを用いて決定した。

In vitro 形質転換

In vitro 形質転換はセフェキシム耐性シプロフロキサシン感受性株 NG0003 (各々 MIC 0.25 µg/ml, 0.25 µg/ml) およびセフェキシム感受性シプロフロキサシン耐性株 NG0202 (各々 MIC 0.004 µg/ml, 8.0 µg/ml)を用いて行った。両株をGC液体培地中で一晩混合培養し、セフェキシム(0.031 µg/ml) およびシプロフロキサシン(2.0 µg/ml)両剤を含むGC寒天培地を用いて、両剤耐性株を分離した。

C. 研究結果

神奈川県衛生研究所によって1995-2005年の間に分離保存された197株についてMLST解析を行った。計35種のST型が見いだされたが、そのうちST7363 (n=52, 26.3%), ST7359 (n=33, 16.7%), ST1901 (n=30, 15.2%), ST1590 (n=14, 7.1%)の4つのST型を示す菌株が10株以上見いだされ、分離頻度が高いST型であった(図1)。

これら4つの分離頻度の高いST型について、分離年ごとの分離率を示した(図2)。ST7359は1995年に分離率70%であったがその後漸減し、2001年以降その分離が認められなかった。ST1590は少数ながら1995年から分離されていたが、2003年以降その

分離は認められなかった。一方で、ST7363 は 1997 年に初めて見いだされ、2001 年をピークとしてその後漸減傾向となっていた。ST1901 は 2000 年以降分離されはじめ、2005 年の分離株の約 45%を占めていた。

東京で分離された 148 株の解析からも 2000 年以降では、ST1901 (n=42, 28.4%) および ST7363 (n=28, 18.9%)が優先株であった。2000 年以降、神奈川県および東京都で拡散していた淋菌は ST7363 および ST1901 であったことが示唆された。

高頻度で分離される ST 型が経時的に変化し優先 ST 型が変化していくことから、各 ST 型において何らかの表現系の違いがあることが推測された。臨床現場で使われる抗生物質の変化と菌株の薬剤感受性との違いが、この優先型の変遷と関連している可能性を考えられた。図 3 にそれぞれの ST 型におけるセフェキシムおよびシプロフロキサシンに対する耐性率を示した。ST7363 に属する淋菌は、その 60%がセフェキシム耐性であり、シプロフロキサシン耐性は 40%程度であった。一方、ST1901 ではセフェキシム耐性は約 20%程度にとどまるが、シプロフロキサシン耐性は 90%程度を超えていた。2000 年以降優先型となった ST7363 および ST1901 とは対照的に分離頻度が減少した ST7359 に関しては、両剤に対する耐性化がほとんど見られなかった。国内において、シプロフロキサシン耐性化は 1990 年前半から認められはじめ、徐々にその耐性度が上昇するとともに、分離頻度が高まってきたことが示されている。ま

た、セフェキシム耐性株は 1990 年代後半に日本において出現した新規耐性淋菌であり、2000 年以降その分離頻度が上昇したことが知られている。このような、耐性株の出現がある特定の ST 型で認められ、その後クローナルな拡大があったと想定すれば、細菌の系統を反映すると考えられる MLST 法による型別が経時的に変遷することを説明することが可能である。

セフェキシム耐性株は PBP 2 をコードする *penA* 遺伝子の一部が、淋菌の *penA* 遺伝子と他のナイセリア属細菌の *penA* 遺伝子とのキメラ様構造を示すことが知られている。セフェキシムに対する結合親和性がこのモザイク型 *penA* 遺伝子(*penA-X*)から産生される PBP 2-X においては低いことが、その耐性に関与していると考えられている。これまでの解析から、ST7363 株において *penA-X* の形成が起きたことが推測されている。本研究においても、セフェキシム耐性株のなかで ST7363 に属する株が最も多いことは、セフェキシム耐性株の ST7363 起源説を支持する。

では、もう一方の優先型 ST1901 における、セフェキシム耐性株の *penA* 配列も同様な構造を示すのだろうか？

ST7363 セフェキシム耐性株 51 株中 39 株の *penA* 配列を決定したところ、*penA-X* は 36 株に存在した。*penA* 配列を解析した ST1901 セフェキシム耐性株 14 株のなかで *penA-X* 配列は 5 株から見いだされた。ST7363 で起きたと考えられる *penA* 遺伝子における他のナイセリア属菌由来との組

換えが、ST1901 においても独立して起きた可能性と、ST7363 で形成された *penA-X* が淋菌株間、つまり ST7363 から ST1901 に伝播した可能性が考えられた。全く同一の配列との組換えが独立に起きる前者の可能性は著しく低いと想定されることから、淋菌株間での *penA-X* の伝播の結果であることが推測された。

ST7363 から ST1901 に *penA-X* が伝播した可能性を検討するために、*in vitro* での形質転換実験を行った。ST7363 セフェキシム耐性かつシプロフロキサシン感受性株 NG0003 (各々 MIC 0.25 µg/ml, 0.25 µg/ml) および ST1901 セフェキシム感受性かつシプロフロキサシン耐性株 NG0202 (各々 MIC 0.004 µg/ml, 8.0 µg/ml) を用いて行った形質転換実験からは、容易に両剤耐性株を分離することが可能であった (図 4)。この両剤耐性株がどちらの菌株に由来しているのかを MLST 法および PFGE 法で確認した。ランダムに選択した両剤耐性 12 株は、全て ST1901 であった。制限酵素 *SpeI* 処理による genomic DNA の切断パターンは、NG0202 と両剤耐性 12 株は同一であり (図 5)、ST1901 NG0202 由来であることが確認された。

また、これらの 12 株中 8 株は *penA-X* 配列を獲得していた。また、残りの 4 株のうち 3 株は点変異による多様性がみとめられた (図 6 B)。また、1 株は組換え領域が *penA-X* 特異的領域の内部に存在することが示唆され、組換え位置の多様性で形成されたことが推測されるものであった (図 6

B)。形質転換体の出現数から、5000 細胞に 1 の割合で、ST1901 が ST7363 から *penA-X* 配列を獲得したこと、菌株間での自然形質転換において新しい多様性が形成されることが示された。

NG0003 株から NG0202 株への *penA-X* 配列の伝播と染色体への組換えが試験管内実験で示されたので、組換え末端について詳細に検討した。まず、NG0003 (*penA-X*) 株および NG0202 (*penA-X*) 株の *penA* 遺伝子を含む全長 6.3 kb の領域 (*mraW-ngo1543-penA-murE-dcaA*) の塩基配列を決定し比較した。100 bp ごとの配列一致度を図 6 A に示した。NG0003 および NG0202 株の塩基配列一致度は *penA-murE* 領域を除いては非常に高く *dcaA* 遺伝子に 3-bp のみの相違が認められた。一方、*penA-murE* にわたる領域で 95% 以下であった (*penA-murE* 多様性領域)。他のナイセリア属細菌からの DNA の獲得領域は図 6 B で黒 (NG0003) あるいは灰色 (NG0202) で示した *penA-murE* 多様性領域であることが推測された。

試験管内形質転換実験から得られたセフェキシム耐性かつシプロフロキサシン耐性株の本領域の塩基配列を決定し、比較した (図 6 B)。*penA-X* を獲得した 8 株 (Type I) はすべて *dcaA* 遺伝子の多様性を含めて NG0003 株と完全に一致した。このことから、少なくとも 4-kb にわたる *penA-murE-dcaA* 領域が NG0003 から NG0202 へ伝播したことを示した。*penA* 領域の多様性が認められた 4 株 (Type II

-V)のなかでType IIおよびType VはDNAの組換え末端が、それぞれ *penA-murE* 多様性領域の内部に存在することが示唆された。加えて、*penA* 遺伝子で認められた点変異の導入がType IIIおよびType Vにおいては *murE* 遺伝子にも認められ、淋菌株間での *penA* 遺伝子領域の伝播に関連して、点変異の導入を介した新たな多様性が形成される可能性を示唆した。

試験管内形質転換実験で明らかにされた *penA* 遺伝子領域の伝播が実際に起こってきたのかを検討するために、ST1901 淋菌の *penA-murE-dcaA* 領域の塩基配列を決定し、NG0003 (ST7363)および NG0202 (ST1901)の同領域との比較解析を行った。用いた ST1901 菌株はセフェキシム感受性株として、NG0402 (神奈川県 2004 年分離)を、またセフェキシム耐性株として NG0002 (神奈川県 2000 年分離)、NGON03-079 (東京都 2003 年分離)、NGON03-092 (東京都 2003 年分離)、NGON03-115 (東京都 2003 年分離)、NGON07-002 (東京都 2007 年分離)の 5 株を用いた。セフェキシム感受性 NG0402 は形質転換実験に用いた ST1901 セフェキシム感受性 NG0202 株と解析領域全長で同一の塩基配列であったことから、ST1901 セフェキシム感受性株に共通に認められる配列であることが示唆された。セフェキシム耐性 ST1901 株のうち、4 株(NG0002, NGON03-079, NGON03-092, NGON03-115)は形質転換実験に用いたセフェキシム耐性 ST7363 株 NG0003 と完全

に一致し、形質転換実験で得られたセフェキシム耐性 ST1901 (Type I)形質転換体とも完全に一致した。このことより、試験管内形質転換実験で示された *penA* 領域の菌株間の伝播が *in vivo* でも起きていることを示唆することとなった。セフェキシム耐性 ST1901 NGON07-002 においては、*penA-murE* 多様性領域はセフェキシム耐性 ST7363 株 NG0003 と同一であったが、*dcaA* 遺伝子多様性部位においては、セフェキシム感受性 ST1901 NG0202 と同一であり、*penA-murE* 多様性領域と *dcaA* 遺伝子多様性部位との間で組換えが起きたことを示唆した。この結果は、試験管内形質転換実験で認められた *penA* 遺伝子領域伝播に関連する多様性形成と一致することを示唆する結果と考えられた。

D. 考察

淋菌の分子タイピング法を利用して、神奈川県および東京都で分離された株について解析をおこなった。神奈川県分離株の解析から、2000 年前後において分離される淋菌の系統が変化した可能性が示唆された。この時期は国内でセフェキシム耐性淋菌が出現し分離率が上昇した時期、あるいはシプロフロキサシン耐性の高度化が進行した時期と重なる。

1990 年代後半から分離頻度が高まった ST7363 は、セフェキシム耐性率が最も高く、セフェキシム耐性獲得が分離頻度の上昇と密接に関連している可能性が示唆された。

同様に 2000 年以降分離頻度が上昇した ST1901 は、シプロフロキサシン耐性率が極めて高いことで特徴づけられる。ギリシャにおけるシプロフロキサシン耐性淋菌の大部分が ST1901 であることが最近明らかにされた (B. Spratt, personal communication)。ST1901 淋菌の国際的蔓延に関して今後の詳細な解析が必要であると考えられる。

ST1901 淋菌の一部は、セフェキシム耐性を獲得していることが、本研究で示された。さらにその一部が、ST7363 が持つ *penA-X* 遺伝子を完全に同一であることから、*penA-X* の菌株間伝播が推測された。本研究では、混合培養法を用いて試験管内形質転換実験系を確立した。淋菌の外来性 DNA 獲得能力 (形質転換能) が極めて高いことが知られていたが、混合培養においてその効率は 1/5000 程度であることが初めて示された。DNA の伝播における受容側および供与側の詳細な分子機構について今後の検討が必要であるが、淋菌の持つ非常に高い形質転換効率が薬剤耐性遺伝子の淋菌株間での伝播に重要な役割を担っている可能性が示された。この薬剤耐性遺伝子の淋菌株間伝播が、コミュニティにおける淋菌耐性率の速やかな上昇に関与している可能性が高く、分離淋菌の分子タイピングを利用した解析が重要である。

分子タイピングを通して分離淋菌の特性を把握し、地域間で比較することでより詳細な治療ガイドラインの提案が可能になると考えられる。

E. 結論

系統解析 (MLST 法)、薬剤耐性遺伝子の多様性解析 (*penA*) を通じて、関東地域で分離される淋菌の分子的特性を理解することに成功した。また、薬剤耐性淋菌の拡散様式を明らかにすることが出来た。今後新たに出現する耐性淋菌の迅速な対応策の立案に貢献する基礎データとなることが期待される。

分離淋菌の地域的相違を比較することで、各地域で伝播している菌株の特性を把握することが可能となることが考えられる。地域的相違を把握することで、治療ガイドラインのより効果的な提案が可能となる。

特に、耐性遺伝子の水平伝播により、異なる遺伝型の淋菌が耐性化する機構は、異なる淋菌株が混合した感染形態が存在することを示唆することになる。推定される混合感染の抑止が耐性淋菌の抑圧に重要であることが示唆された。

参考文献

- Muratani, T., et al. 2001. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3603-3606.
- Ameyama, S., et al. 2002. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3744-3749.
- Ito, M. et al., 2005. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 137-143.
- Jolley KA. 2001. *Meningococcal Disease: Methods and Protocols*, Human Press, New Jersey.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohnishi, M., Watanabe, Y., Ono, E,
Takahashi, C., Oya, H., Kuroki, T.,
Shimuta, K., Okazaki, N., Nakayama, S.
and Watanabe, H.

Spreading of a chromosomal cefixime
resistant *penA* gene among different
Neisseria gonorrhoeae lineages.
Antimicrob. Agents Chemother. 2010, 54:
1060-1067.

2. 学会発表

Ohnishi, M., Watanabe, Y., Shimuta, K.
and Watanabe, H.

Horizontal transfer of *penA* allele
between two different lineages of
Neisseria gonorrhoeae.
18th International Society for STD
research, London, 2009

大西 真、渡辺祐子、志牟田健、黒木俊郎、
岡崎則男、渡邊治雄
染色体性セフェキシム耐性遺伝子 *penA* 遺
伝子の淋菌株間での水平伝播
日本細菌学会関東支部総会，東京，2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし