

子宮頸管炎に対してセフトリアキソン静注 1.0 g 単回投与が推奨ランク A であるのに対して、セフォジジム静注 1.0 g とスペクチノマイシン筋注 2.0 g の単回投与は推奨ランク B とされている。その理由は、性器の淋菌感染症において 10~30% 程度に陽性とされる咽頭の淋菌感染にセフトリアキソンは有効であるのに対し、セフォジジム、スペクチノマイシンは十分な除菌ができないためとされている。このガイドラインに示されているように現在、淋菌感染症に対してわが国で推奨できる薬剤はこの 3 剤しかないが、これはわが国において淋菌の薬剤耐性化の傾向がいぜんとして続いており、経口薬を含め、90% 以上の効果が期待できる薬剤が他に存在しないからである⁹⁾(表 4)。

なお、性器クラミジア感染症についてはガチフロキサシンが 2008 年 9 月をもって発売が中止されたため、推奨薬から削除されているが、その他の薬剤については変わっていない。ただ、尿道炎、子宮頸管炎に分けて推奨ランクが記載されていることと、妊婦、非妊婦によって推奨ランクが明確にされたことが重要である¹⁰⁾(表 5)。

文献

- 1) 村谷哲朗：尿路感染症起炎菌での抗菌薬耐性菌の

割合は増加しているか？ EBM—泌尿器疾患の治療 2009-2010(後藤百万・他編)。中外医学社、2009, pp.459-464.

- 2) 安田 満・他：複雑性尿路感染症分離菌の薬剤感受性について。第 56 回日本化学療法学会プログラム、2008 年 6 月 7 日、岡山, p.163.
- 3) 日本感染症学会、日本化学療法学会(編)：(内科系感染症)尿路感染症—急性単純性腎盂腎炎・膀胱炎。抗菌薬使用のガイドライン。協和企画、2005, pp.138-140.
- 4) Warren, J. W. et al. : Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. *Clin. Infect. Dis.*, **29** : 745-758, 1999.
- 5) 宮崎修一・他：日常診療に役立つ抗菌薬の PK/PD(戸塚恭一監)。ユニオンエース、2006, pp.28-31.
- 6) 荒川創一・他：急性単純性膀胱炎に対する cefcapen pivoxil 300 mg 7 日間投与の臨床効果—3 日後と 7 日後の臨床効果の比較。日本化学療法学会雑誌, **57** : 304-310, 2009.
- 7) 岡部信彦、多田有希：感染症発生動向調査からみたわが国の STD の動向、性感染症に関する特定感染症予防指針の推進に関する研究班(研究代表者：小野寺昭一)、平成 20 年度総括研究報告書、2009, pp.15-34.
- 8) 小野寺昭一：わが国における性感染症の現状と問題点—厚生労働科学研究を通じて見えてきたもの。日本性感染症学会雑誌, **19** : 16-30, 2008.
- 9) 淋菌感染症。性感染症—診断・治療ガイドライン 2008。日本性感染症学会雑誌, **19**(Suppl.) : 49-56, 2009.
- 10) 性器クラミジア感染症。性感染症—診断・治療ガイドライン 2008。日本性感染症学会雑誌, **19**(Suppl.) : 57-61, 2009.

* * *

日本臨床 第67巻・第1号(平成21年1月号)別刷

特集：性感染症(STD)

我が国における性感染症の現状と将来

小野寺昭一

総 論

我が国における性感染症の現状と将来

小野寺昭一

Status and future of sexually transmitted diseases in Japan

Shoichi Onodera

Department of Infection Control, Jikei University School of Medicine

Abstract

According to the results of the fixed-point survey, the incidence of both genital chlamydial infection and gonococcal infection has tended to decrease since 2003 in Japan. This trend has been more marked in young persons of both sexes. However, it has been suggested that the fixed-point survey has a problem with respect to the method of selecting designated medical institutions for notification. Moreover, it should be remembered that there are many patients without symptoms in addition to patients with symptomatic sexually transmitted diseases.

We performed a group study of patients with asymptomatic sexually transmitted diseases over 3 years. As a result, it was confirmed that the prevalence of asymptomatic genital chlamydial infection was highest among female high school students aged 16–18 years, and was approximately 5% even among healthy men in their twenties. Based on these results, to prevent the spread of sexually transmitted diseases in the young, it seems necessary to perform large-scale screening for these diseases (especially in young persons) and establish a system that allows the results of screening to ensure early detection and treatment of sexually transmitted diseases.

Key words: sexually transmitted diseases, fixed-point survey, census survey, asymptomatic genital chlamydial infections

はじめに

我が国における性感染症の動向については、感染症法のもとで行われている感染症発生動向調査から知ることができるが、その対象となっている疾患は、定点把握の性器クラミジア感染症、性器ヘルペス、尖圭コンジローマ、淋菌感染症の4疾患と、全数把握が行われている

HIV/エイズ、梅毒の6疾患である。

本稿では、この発生動向調査のデータをもとに、HIV/エイズを除く5疾患の最近の動向について述べるが、併せて、著者らが行っている4モデル県における性感染症全数調査の結果の一部を紹介し、性感染症発生動向調査の問題点についても言及してみたい。更に我が国の無症候の性感染症患者の実態についても概説し、我が

東京慈恵会医科大学 感染制御部

0047-1852/09/¥40/頁/JCLS

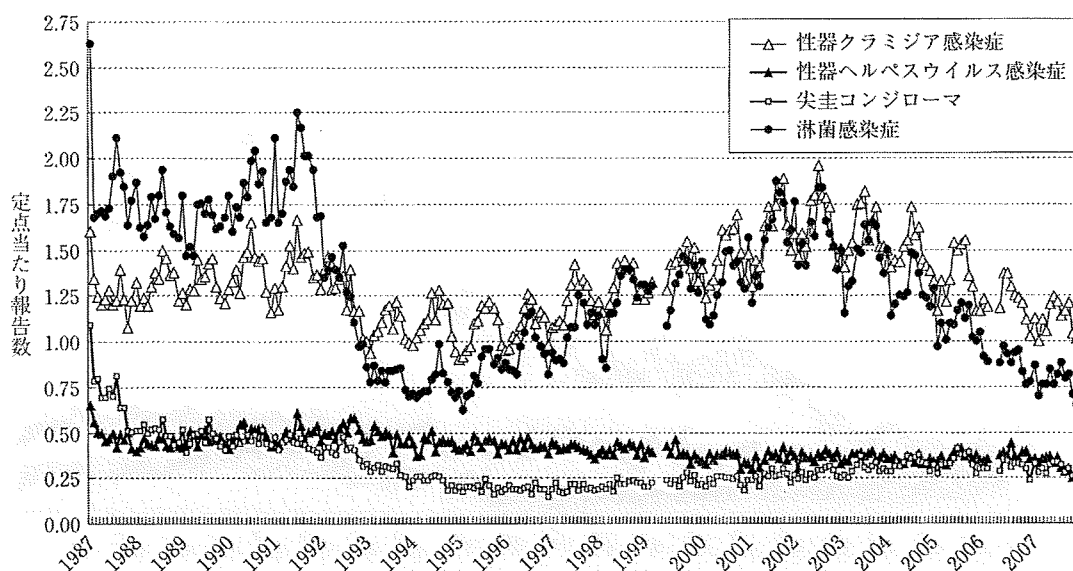


図1 定点把握4性感染症の年次推移(1987-2007年, 男性)
感染症発生動向調査。

国の性感染症の今後の課題について述べる。

1. 我が国における性感染症の現状

a. 定点把握4疾患の現状

1) 男性における性感染症の動向

男性における4つの性感染症の1987年から2007年までの発生動向調査による年次推移は、図1に示した¹⁾。このうち、淋菌感染症は1993年から著明な減少がみられ1996年頃まで続いた。この患者数の減少は1980年代にHIV/エイズという疾患が出現したことが影響し、他の性感染症も減少した。しかし、残念ながらHIV/エイズに対する関心が薄れるとともに、1997年頃からは再び増加に転じた。男性における性器クラミジア感染症も、淋菌ほどその起伏が大きくはないものの同ような患者推移を示している。ただ、この図からも明らかなように、2002年をピークにして淋菌感染症、性器クラミジア感染症とも減少傾向に転じており、2007年の時点でもその傾向が続いている。性器ヘルペス、尖圭コンジローマに関しては、男性においてはほぼ横ばいか微増でそれほど目立った変化は認められていない。

2) 女性における性感染症の動向

女性においては、性器クラミジア感染症が約60%と圧倒的に多く、第2位が性器ヘルペスで、尖圭コンジローマ、淋菌感染症はほぼ同数となっている¹⁾。なお、この統計では、男性も女性も1999年から2000年にかけて一度途切れ、その後女性のクラミジア報告数が急増しているが、これはこの時点で定点の見直しが行われ、産婦人科定点が意図的に増やされたためである。この定点調査の最近の傾向としては、男性と同様に、女性においても2002年をピークとして2003年からはクラミジアが、2004年からは淋菌感染症の減少傾向がみられている(図2)。

3) 各性感染症の年次別・年齢群別患者報告数

クラミジア感染症、淋菌感染症の年次別、年齢群別報告数を図3、4に示した¹⁾。クラミジアでは、2002年以降、患者数の減少がみられているが、この減少は男女とも10歳代、20歳代の若い世代において目立っている。淋菌感染症においては、10歳代から30歳において減少傾向で40歳以上は不変と、やはりクラミジアと同じような傾向がみられている。

一方、性器ヘルペスでは、男性では10歳代

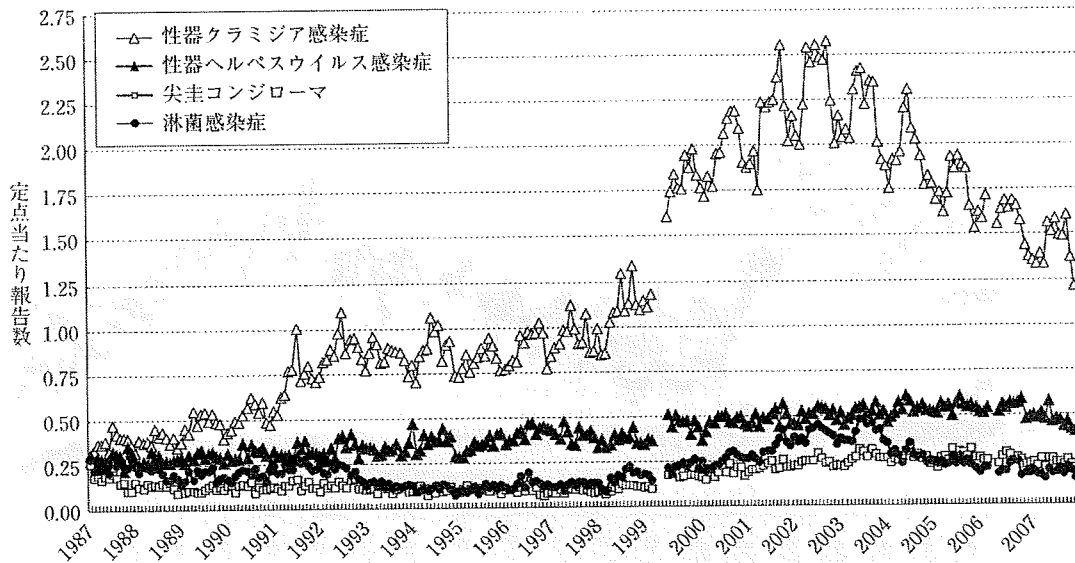


図2 定点把握4性感症の年次推移(1987-2007年, 女性)
感染症発生動向調査。

から60歳代まで, この5年間で大きな変動はみられないが, 女性では, 30歳代, 40歳代においてやや増加する傾向がみられている(図5)¹⁾。性器ヘルペスでは, 一度感染するとウイルスが神経節に潜伏感染し一生再発を繰り返すことになるため, 50歳代, 60歳代の高年齢層からの報告数が少なくないが, このなかには再発例も多く含まれている可能性がある。尖圭コンジローマでは, 男女とも, 20歳代から40歳代まで増加傾向がみられている(図6)。

b. 梅毒の動向

全数把握が行われている梅毒の, 2000年以降, 2007年までの年次推移について図7に示した。2000年以降, 2003年までは緩やかな減少がみられていたが, 2004年には増加に転じ, 2007年の時点でも増加傾向がみられている。これを病型別にみると先天梅毒, 晩期顕症梅毒は横ばいになっているが, 早期顕症梅毒I, II期, 無症候梅毒ともにここ数年間において増加がみられている。更に, 2006年の報告数を男女別, 年齢別病期別にみても, 男性では, 早期顕症は15-19歳の年齢群から始まり, 30歳代にピークがあるが, 女性では早期顕症梅毒のピークは, 15-19歳がピークとなっており, 年

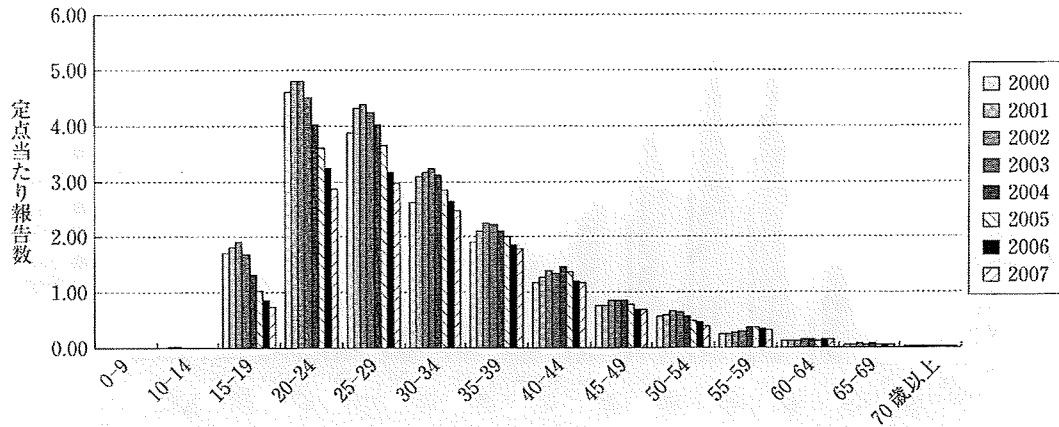
齢が高くなるにつれて報告数が減っている¹⁾。このことは, 梅毒において, 感染者の若年層化が進行していることを示唆するものであり, 今後の注意深い観察が重要である。

c. 性感症の全数調査からみた性感症の現状

著者らは, 平成18年度の厚生労働省科学研究補助金を受け, '性感症に関する特定感染症予防指針の推進に関する研究'班をスタートさせた。本研究班の研究の目的の一つとして, 地域を限定した性感症の全数調査と性感症の定点医療機関の選定方策に関する研究を行うこととなっており, それに沿った形で平成18年度は, 千葉, 石川, 岐阜, 兵庫の4モデル県における性感症の全数調査を施行した。調査期間は, 平成18(2006)年の11月1日から30日までの1カ月間である²⁾。

対象疾患は, 5種の性感症で, 梅毒, 淋菌感染症(性器および咽頭), 性器クラミジア感染症(発症者および妊婦検診), 性器ヘルペスウイルス感染症(初発あるいは初感染および再発), 尖圭コンジローマで, 診断は感染症法に定められた届出基準に従って行った。調査は郵送法により行ったが, この4モデル県における調査票

a. 男性



b. 女性

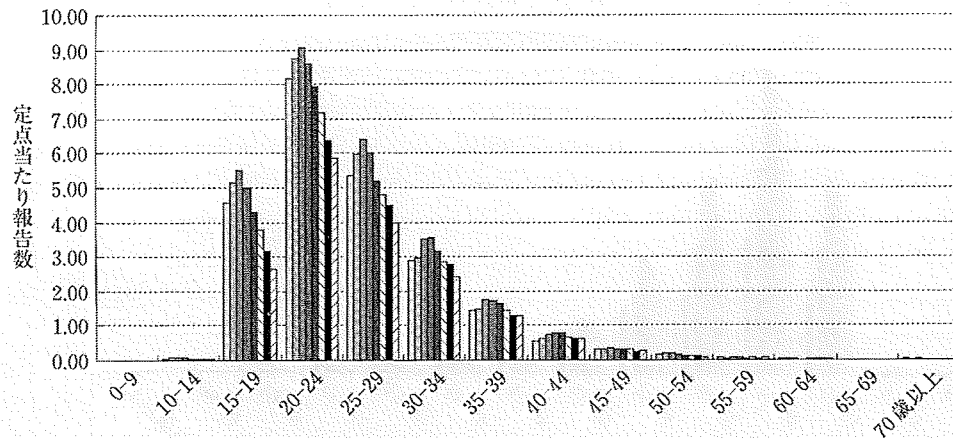


図3 性器クラミジア感染症の年次別/年齢群別定点当たり報告数
感染症発生動向調査, 2008年1月16日現在.

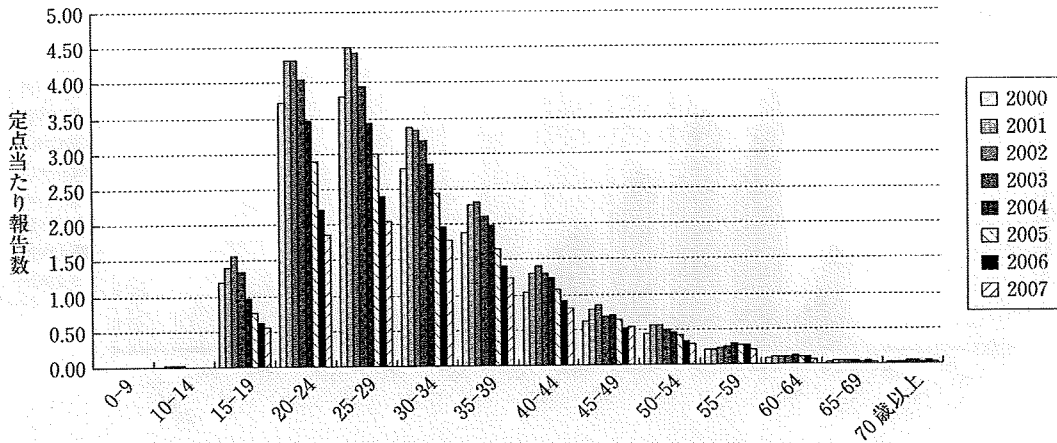
の回収率は50-60%であった²⁾.

淋菌感染症, 性器ヘルペスウイルス感染症 (初発あるいは初感染), 尖圭コンジローマ, 性器クラミジア感染症 (発症者) の4県合計の患者数を人口10万人当たりのグラフとして図8-11に示した. 年齢分布を今回調査と発生動向調査とに分けてグラフに示しているが, 棒グラフが今回調査の患者数, 折れ線グラフが発生動向調査 (定点調査) の対象となっている施設からの患者数である.

まず淋菌感染症であるが, 今回対象とした5疾患の中で, 淋菌感染症は, 今回調査と発生動

向調査による患者の年齢分布が男女ともよく一致していた. 一方, 性器ヘルペスウイルス感染症は, 発生動向調査では, そのピークが男女とも20歳代前半にあり, 女性では今回調査と年齢分布が比較的一致していたが, 男性ではより高い年齢層での分布に乖離がみられた. また, 10歳代後半の女性において今回調査と発生動向調査の患者数の乖離が大きく, 今回調査の患者数が発生動向調査の患者数の約4.5倍になっていた. また, 男女比をみると, 発生動向調査では, 10歳代の性器ヘルペス患者数は, 男女同数となっているが, 今回調査では, 女性は男性

a. 男性



b. 女性

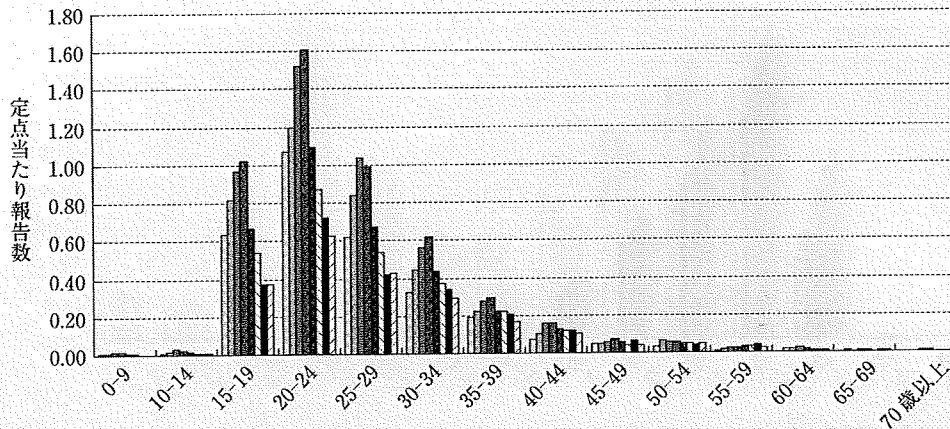
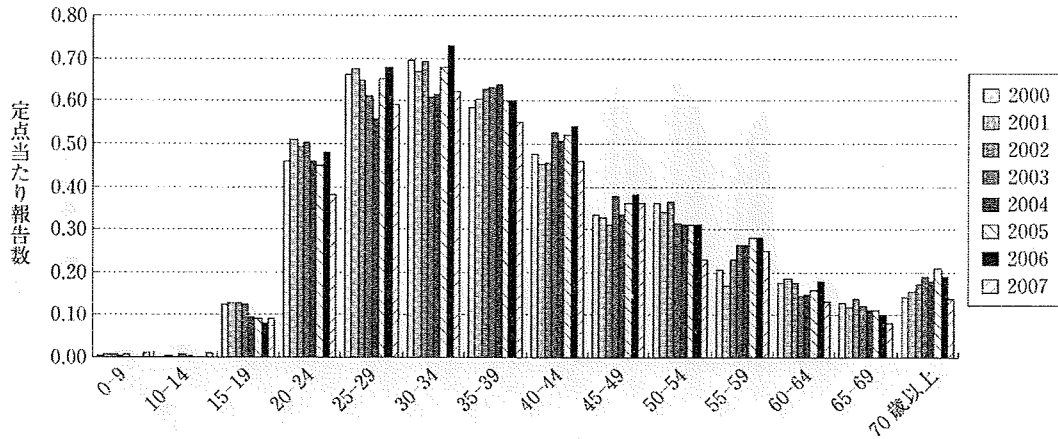


図4 淋菌感染症の年次別/年齢群別患者定点当たり報告数
感染症発生動向調査, 2008年1月16日現在.

の約9倍の患者数であり、全体をみても女性の患者数は男性の約2.3倍であった。尖圭コンジローマでもざっと見た場合、ヘルペスと同様の傾向がみられたが、ここでも今回調査における10歳代後半の患者数が発生動向調査の患者数を大きく上回っていただけでなく、男女比も乖離が大きかった。性器クラミジア感染症(発症者)では、20歳代以上の年齢層においては、年齢分布も男女比も比較的一致していたが、10歳代後半の若年層において特に女性での患者数の乖離がみられ、男女比も今回調査では、女性比は男性の約5.8倍であった。

以上、平成18年度の性感染症全数調査結果をまとめてみると、淋菌感染症では、定点での年齢分布は比較的良好であり、今回の全数調査とよく一致していたが、性器クラミジア感染症、性器ヘルペス、尖圭コンジローマでは、特に10歳代後半の患者数において今回調査と発生動向調査で乖離がみられることがわかった。このことは、若い世代の患者が定点とされている医療機関にはあまり受診していないことを示すものである。最初に述べたように、我が国では、定点調査をみるかぎり、性器クラミジア感染症、淋菌感染症とも、特に若年世代においてここ数

a. 男性



b. 女性

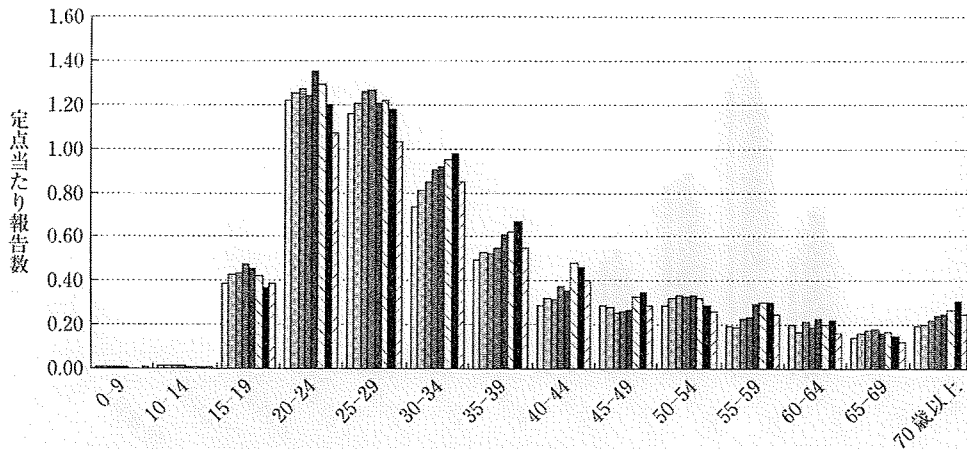


図5 性器ヘルペスウイルス感染症の年次別/年齢群別患者定点当たり報告数
感染症発生動向調査, 2008年1月16日現在.

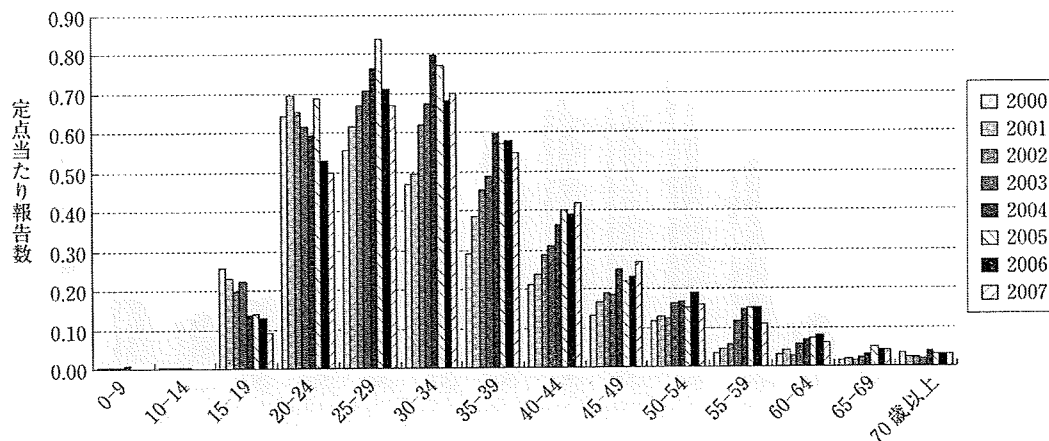
年著明な減少傾向がみられているが、今回の著者らの全数調査から、現時点での定点の設定が10歳代の性感染症患者の実態を正確にとらえていない可能性があることが明らかになった。今回の全数調査に基づき、改めて定点の設定方法の見直しとその基準を明確にする必要があるのではないかと考えられた。

d. 我が国における無症候性性感染症患者の現状

これまで我が国の性感染症の疫学的動向について、発生動向調査と、地域を限定した性感染症全数調査の結果をもとに述べてきたが、これ

らの患者数はあくまでも医療機関を受診した性感染症患者の届出数であり、その背景には多くの無症候の性感染症患者が存在することを忘れてはならない。性器クラミジア感染症に関しては、男性の15-20%、女性の70-80%は無症候といわれており、自覚症状がないために医療機関を受診しない潜在的な性器クラミジア感染症患者が多数存在することが想像される。更に、淋菌感染症に関しては、無症候の咽頭の淋菌感染者が存在することも重要な問題である。このような無症候感染者は、自覚のないままに感染源となって新たな感染者が増加する温床と

a. 男性



b. 女性

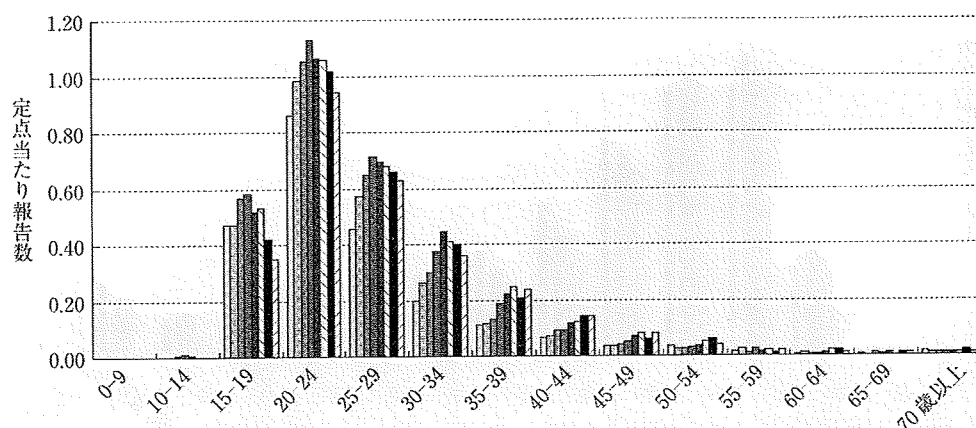


図6 尖圭コンジローマの年次別/年齢群別患者定点当たり報告数

感染症発生動向調査, 2008年1月16日現在.

なっていることも事実である。こうした状況を踏まえて、性感染症における無症候感染症の問題について、著者らが行っている患者の実態調査を紹介し、今後どのような対策を取るべきか考えてみたい。

表1には著者らが行った性感染症における性器クラミジアの無症候感染者のスクリーニング検査のまとめを示した。検査法は男性では初尿を検体とし、女性では高校生を対象とした場合は初尿、それ以外では自己採取による陰分泌物流し、検査法はいずれもPCR法で行っている。まず若年の健康男性ボランティア約200人を対

象とした調査では、全体のクラミジア陽性者は3.4%、このなかでいわゆる sexually active と考えられる男性の陽性率は4.7%であった³⁾。また、ある県の高校生の男女約5,000人を対象とした大規模スクリーニング調査では、クラミジア陽性者は男子7%、女子13%と極めて高い結果であった⁴⁾。更に、各種の学校や看護系大学などの若年者の調査では、クラミジア陽性者は男子9.5%、女子8.4%であった⁵⁾。同様に、東京都内で行われた若者向けのイベント時に行った性感染症検査希望者の調査では、性器クラミジアの平均陽性率は7.6% (男性: 5.8%, 女性:

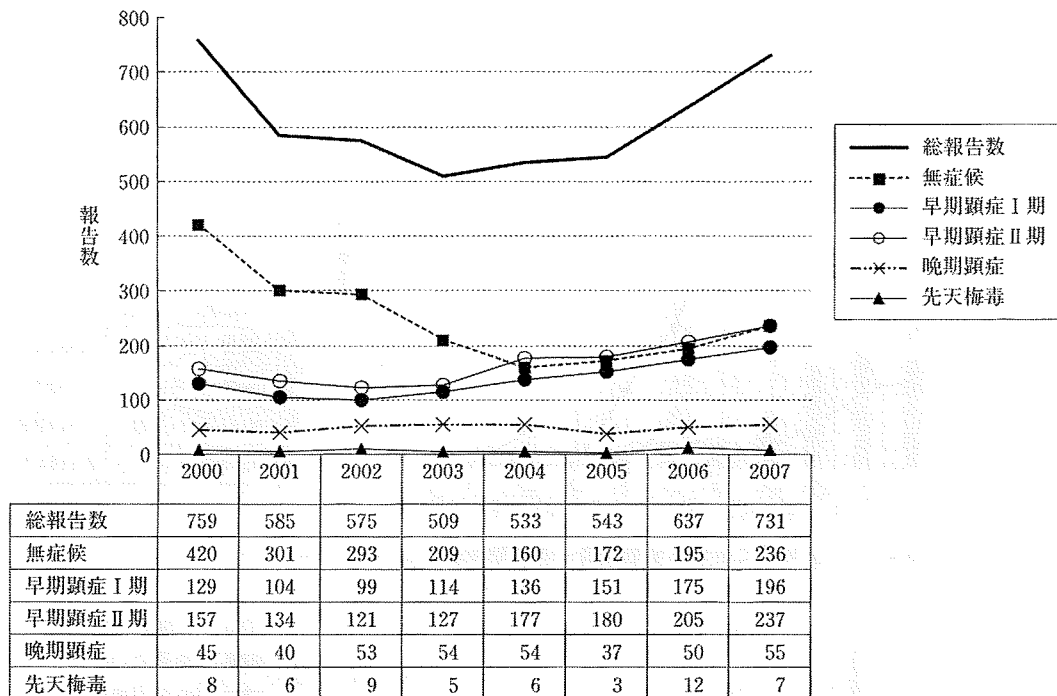


図7 病型別梅毒患者報告数の年次推移(2000-07年)
感染症発生動向調査, 2008年2月3日現在.

8.6%)という結果であった⁶⁾。淋菌の無症候感染者に関しては、いずれの調査においても陽性率は極めて低かった。これらの調査から性器クラミジアに関し、我が国の若者における無症候の有病者は5-10%程度にみられることがわかった。

Millerらは、米国において2001年から2002年まで、全米の若年成人(18-26歳)の代表サンプル14,332人を対象として前向きコホート研究を行い、全体におけるクラミジア感染症の有病率は男性で3.6%、女性で4.7%と報告している⁷⁾。この有病率にはかなりの人種差があることが指摘されているが、これらの成績と著者らの調査を比べても我が国における若年者の陽性率は高く、我が国における性感染症対策はまだまだ十分とはいえないことは明らかである。

2. 我が国の性感染症の今後の課題

我が国における性感染症の現状について、性

感染症発生動向調査と地域を限定した性感染症全数調査の結果を示して述べてきた。定点調査をみるかぎり、我が国の性器クラミジア感染症、淋菌感染症は特に10歳代から20歳代の若年者においてここ数年減少傾向にある。しかし、4モデル県における全数調査では、特に、10歳代の女性の患者数において定点調査と全数調査で乖離があることが明らかになり、この世代の女性患者は定点に指定されている医療機関には受診していない可能性が示唆された。このことは、今後、定点の見直しをする際に、若年世代の性感染症患者が欠落しないような定点設計の基準を定める必要があることを示している。更に性感染症患者の実数が推定できるような、何らかの追加的サーベイランスも継続して行って、その実体について検証していくことが必要である。

最近、若年女性における妊娠中絶の件数は2001年頃をピークに減少し、性交経験の若年化にも歯止めがかかっていると報告がみられる⁸⁾。また、こうした中絶件数の減少と若年

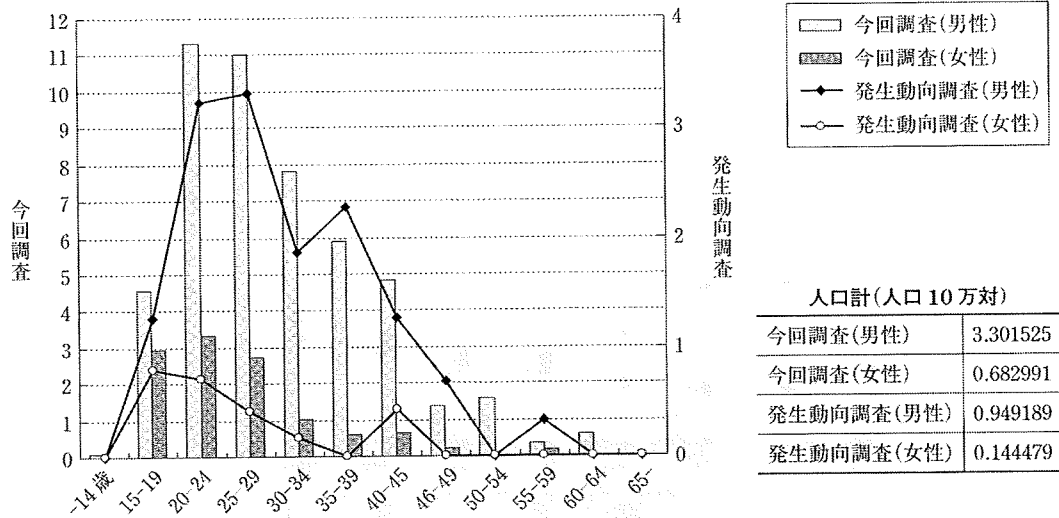


図8 4モデル県における全数調査—淋菌感染症(4県合計, 人口10万人当たり)

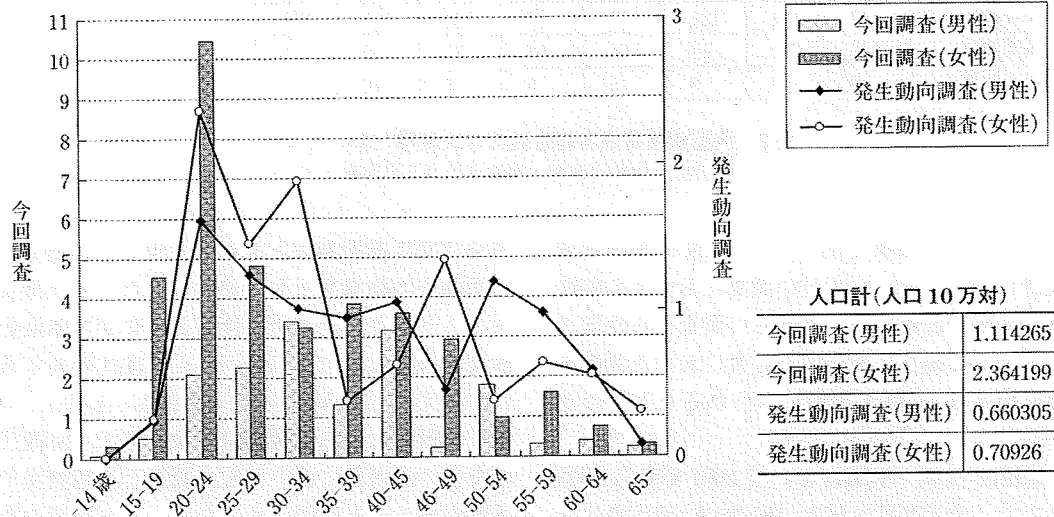


図9 4モデル県における全数調査—性器ヘルペスウイルス感染症(初発あるいは初感染)
(4県合計, 人口10万人当たり)

世代における性器クラミジア感染症患者の減少は連動しており、第一線で性教育に携わる教育関係者の取り組みが予防意識の向上や予防行動の普及に結びついているとする報告もある⁹⁾。しかし、我が国におけるこうした取り組みはまだまだ十分とはいえない。

性感染症は予防可能な疾患であるだけでなく、

早期発見・早期治療により将来起こりうる合併症を防ぐことが可能な疾患である。若者を対象として、性感染症に対する正しい知識を教える機会をできるだけ増やしていくことが重要であるが、更に、若者が性感染症検査を受けやすい体制を行政、NGOなどが連携しつつ構築していくことも必要であろう。

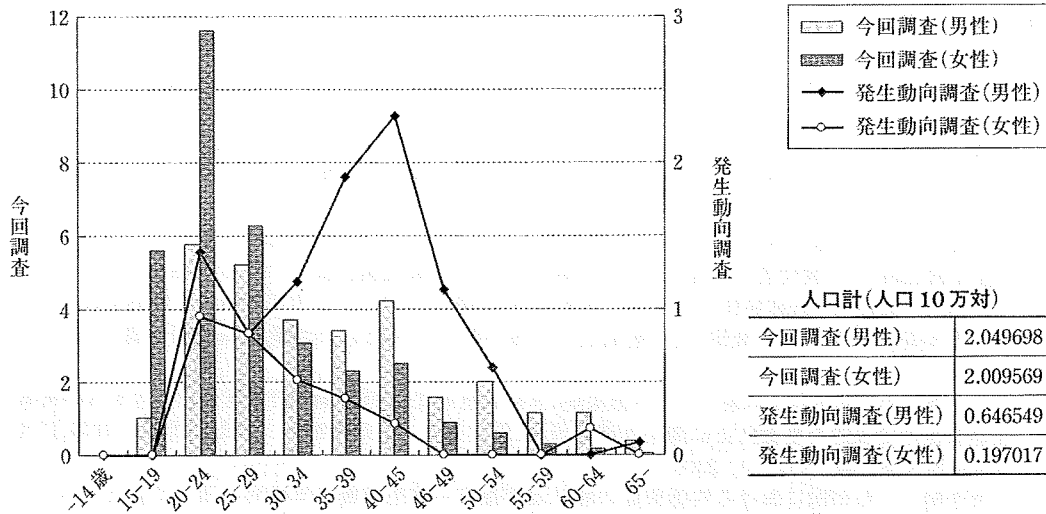


図 10 4モデル県における全数調査—尖圭コンジローマ
(4県合計, 人口10万人当たり)

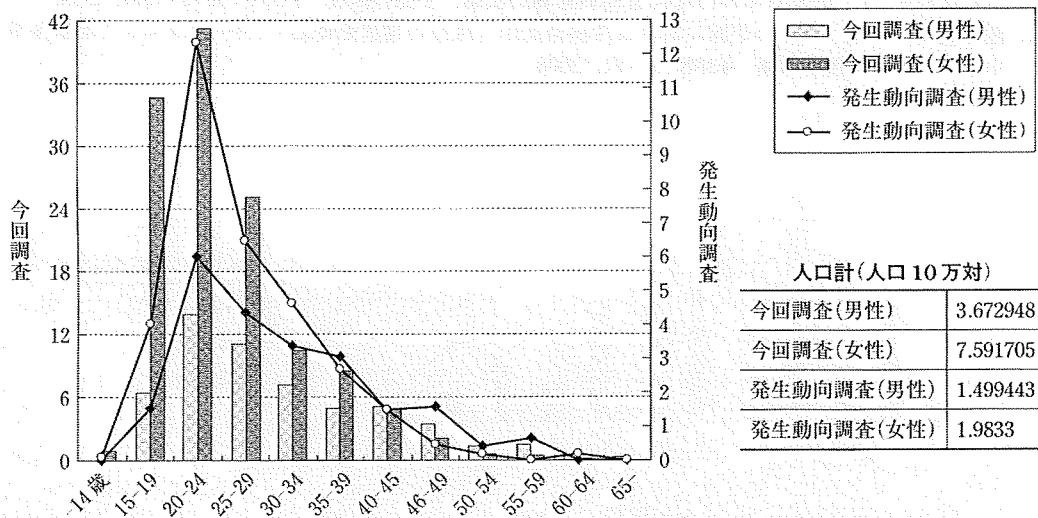


図 11 4モデル県における全数調査—性器クラミジア感染症(発症者)
(4県合計, 人口10万人当たり)

表 1 性器クラミジア感染症の無症候感染者スクリーニングのまとめ

- ・若年健康男性ボランティア 204 人の調査では, クラミジア陽性者は 4.7%であった。
- ・高校生男女生徒を対象とした 5,000 人規模の無症候クラミジア感染症の調査では, 男子 7%, 女子 13%の陽性率であった。
- ・学校や産婦人科の思春期相談で行った調査では, クラミジアの陽性率は, 性交経験者の女子で 11%, 男子で 9%であった。
- ・東京都内のイベント時の無症候の性器クラミジア感染症の陽性率は, 男性 5.8%, 女性 8.6%であった。

文献

- 1) 岡部信彦, 多田有希: 性感染症発生動向調査からみたわが国のSTDの動向. 性感染症に関する特定感染症予防指針の推進に関する研究班(主任研究者: 小野寺昭一) 平成19年度総括研究報告書, p29-43, 2008.
- 2) 小野寺昭一ほか: 平成18年度4モデル県における性感染症の全数調査—中間報告書—. 性感染症に関する特定感染症予防指針の推進に関する研究班(主任研究者: 小野寺昭一) 平成18年度総括研究報告書, p30-34, 2007.
- 3) 塚本泰司ほか: 健康男性における無症候感染者のスクリーニング. 性感染症の効果的な蔓延防止に関する研究班(主任研究者: 小野寺昭一) 平成16年度総括研究報告書, p39-42, 2005.
- 4) 今井博久: 高校生の無症候性クラミジア感染症の大規模スクリーニング調査研究. 性感染症の効果的な蔓延防止に関する研究班(主任研究者: 小野寺昭一) 平成17年度総括研究報告書, p19-23, 2006.
- 5) 白井千香ほか: 若年者を対象とした性感染症(無症候感染者)の実態調査と蔓延防止システムの構築. 性感染症の効果的な蔓延防止に関する研究班(主任研究者: 小野寺昭一) 平成15年度～平成17年度総合研究報告書, p37-51, 2006.
- 6) 小野寺昭一: わが国における性感染症の現状と問題点—厚生労働科学研究を通じて見えてきたもの—. 日性感染症誌 19: 16-30, 2008.
- 7) Miller WC, et al: Prevalence of chlamydia and gonococcal infections among young adults in the United States. JAMA 291(18): 2229-2236, 2004.
- 8) 早乙女智子: II. 若年者の性の現状 思春期妊娠の実態. 小児科診療 71(8): 1279-1283, 2008.
- 9) 熊本悦明, 川名 尚: わが国における性感染症の大流行の現状を憂えて(1)—クラミジア感染症を中心に—. 日本医事新報 4388: 85-91, 2008.

ORIGINAL ARTICLE

Kazuyoshi Osaka · Tadakazu Takakura · Kayo Narukawa
Masahiro Takahata · Katsuhisa Endo · Hiroshi Kiyota
Shoichi Onodera

Analysis of amino acid sequences of penicillin-binding protein 2 in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone

Received: January 4, 2008 / Accepted: March 4, 2008

Abstract *Neisseria gonorrhoeae* strains with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone, with minimum inhibitory concentrations (MICs) of cefixime of 0.125–0.25 µg/ml and ceftriaxone of 0.031–0.125 µg/ml, were isolated from male urethritis patients in Tokyo, Japan, in 2006. The amino acid sequences of PenA, penicillin-binding protein 2, in these strains were of two types: PenA mosaic and nonmosaic strains. In the PenA mosaic strain, some regions in the transpeptidase-encoding domain in PenA were similar to those of *Neisseria perflavalsicca*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria polysaccharea*, and *Neisseria meningitidis*. In the PenA nonmosaic strain, there was a mutation of Ala-501 to Val in PenA. In addition, we performed homology modeling of PenA wild-type and mosaic strains and compared them. The results of the modeling studies suggested that reduced susceptibility to cepheims such as cefixime and ceftriaxone is due to a conformational alteration of the β-lactam-binding pocket. These results also indicated that the mosaic structures and the above point mutation in PenA make a major contribution to the reduced susceptibility to cephem antibiotics.

Key words Penicillin-binding protein 2 · PenA · *Neisseria gonorrhoeae* · Cefixime · Ceftriaxone

K. Osaka (✉) · M. Takahata
Research Laboratories, Toyama Chemical Co., Ltd.,
2-4-1 Shimookui, Toyama 930-8508, Japan
Tel. +81-76-431-8306; Fax +81-76-431-8208
e-mail: kazuyoshi_oosaka@toyama-chemical.co.jp

T. Takakura · K. Narukawa
Discovery Laboratories, Toyama Chemical Co., Ltd., Toyama, Japan

K. Endo
Department of Urology, JR Tokyo General Hospital, Tokyo, Japan

H. Kiyota
Department of Urology, Jikei University, School of Medicine,
Tokyo, Japan

S. Onodera
Division of Infection Control, The Jikei University School of
Medicine, Tokyo, Japan

Introduction

Gonococcal infections have existed as sexually transmitted diseases since early times and have never been regarded as intractable. In the late 20th century, the significant developments of antimicrobial agents facilitated the treatment and care of gonococcal infection disease.

Penicillins and tetracyclines are used for the treatment of gonococcal urethritis worldwide. After the emergence and worldwide spread of penicillin- and tetracycline-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains, fluoroquinolones were recommended as the primary therapeutic agent for uncomplicated gonorrhea in many countries.¹ Fluoroquinolones have been used extensively for the treatment of gonococcal urethritis due to their high degree of efficacy against the disease. However, intense selection pressure resulting from the continual exposure of *N. gonorrhoeae* to fluoroquinolones induced the emergence of quinolone-resistant strains with altered GyrA and ParC proteins.^{2–6} In 2006, the Centers of Disease Control for prevention (CDC) updated the *Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2006* regarding the treatment of infections caused by *N. gonorrhoeae*.⁷ In these guidelines, the CDC no longer recommends the use of fluoroquinolones for the treatment of gonococcal infections and associated conditions such as pelvic inflammatory disease (PID). In addition, intravenous ceftriaxone, which is a highly potent antimicrobial agent against *N. gonorrhoeae*, is now recommended as a first-line agent in the treatment of gonococcal infections worldwide.

In Japan, the numbers of gonococcal infections, including those resistant to antimicrobial therapy, have gradually increased since the mid-1990s.⁸ Cefixime, an oral cephem, had been used previously, but recently an increased emergence and spread of gonococci resistant to oral cepheims have also been reported.^{9,10} Therefore, the use of cefixime was no longer recommended because the number of ineffective cases was increasing when cefixime was used as a therapeutic agent.¹¹ Nowadays, ceftriaxone and cefodizime, parenteral cepheims, and spectinomycin, an aminoglycoside,

are widely used instead of fluoroquinolones and oral cepheems for the treatment of gonococcal infections.¹¹ However, these strains also acquired reduced susceptibility to cefodizime or ceftriaxone, parenteral cepheems.

N. gonorrhoeae has three penicillin-binding proteins (PBPs), denoted PBP1, 2, and 3. PBP1 and 2 of *N. gonorrhoeae* are the major targets of β -lactam antibiotics. PBP2, encoded by the *penA* gene, has an approximately 10-fold higher affinity for penicillin G than PBP1.¹² In previous reports, the insertion of Asp-345 into the *penA* gene has been proved to make a major contribution to reducing the affinity of gonococcal PBP2 to penicillin G.¹³ Other reports showed that C-terminal amino acid residues of the PenA transpeptidase domain were also altered in penicillin-resistant *N. gonorrhoeae*.^{14–16} In our recent study, the strains with reduced susceptibility to oral cepheems have mosaic structures in the transpeptidase-encoding domain in PenA, which is similar to those of *Neisseria perflava/sicca*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria polysaccharea*, and *Neisseria meningitidis*.¹⁷ These results suggest that the pathogens might have evolved by gene transformation between commensally resistant *Neisseria* spp. and the original susceptible gonococci owing to the existence of widespread commercial oral sex.¹⁷

Other genetic factors have been reported as enhancements of the efflux pump by mutations in *mtrR*, which is an *mtrCDE* transcriptional regulator, and that *penB* loci was due to β -lactam resistance.^{18,19} A single substitution in *ponA* (the *ponA1* allele), which encodes an altered PBP1 with reduced affinity for penicillin, was reported to contribute to high-level penicillin resistance in *N. gonorrhoeae*.²⁰ The *pilQ* (previously named *penC*) gene mutants were reported to increase resistance to penicillin if *penA*, *penB*, and *mtrR* resistance determinants were present.^{20–22}

This study was conducted to investigate the susceptibility to various antimicrobial agents of clinical isolates of *N. gonorrhoeae* isolated in Japan in 2006, and to clarify the mechanism of reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone in *N. gonorrhoeae*.

Materials and methods

Bacterial strains

The *N. gonorrhoeae* strains used in this study were clinical strains isolated from male urethritis patients at Jikei University School of Medicine and related hospitals in 2006. The specimens were directly streaked onto modified Thayer–Martin selective agar (Becton, Dickinson, Tokyo, Japan) in the hospitals. The plates were placed in a Bio-Bag environmental chamber (type C; Becton, Dickinson) and immediately transported to the laboratory, where they were incubated at 35°C for 20 h in a 5% CO₂ atmosphere. The organisms were identified by Gram staining, oxidase tests, and catalase tests. The identities of isolates cultured on Chocolate II agar (Becton, Dickinson) were further confirmed with a Gonochek-II kit (EY Laboratories, San

Mateo, CA, USA). *N. gonorrhoeae* isolates were maintained at –80°C in modified skim milk until antimicrobial susceptibility testing.²³ The isolates were tested for β -lactamase production by a β -check (Nippon Bio-Supp. Center, Tokyo, Japan). In the antibiotic susceptibility test, 47 strains isolated in 2006 were used. In the PenA sequences of *N. gonorrhoeae*, 17 strains with reduced susceptibility to cefixime (minimum inhibitory concentrations (MICs) 0.125–0.25 μ g/ml for strains isolated in 2006), 2 β -lactamase-producing strains, and 3 cefixime-susceptible strains (MICs 0.004–0.008 μ g/ml) were used. In the comparison of PenA sequences of *N. gonorrhoeae*, LM306 (penicillin-susceptible strain; GenBank accession no. M320921),¹⁶ NG-3 (reduced susceptibility to cefixime strain isolated in 2000; GenBank accession no. AB071984),¹⁷ 6 isolates showing reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone in 2006 (NG-109, -110, -118, -120, -121, and -122), one cefixime-susceptible isolate (NG-127), and one β -lactamase-producing strain (NG-128) were used. In the comparison of PenA sequences of *N. gonorrhoeae* and other *Neisseria* species, those of *N. meningitidis* MC58 (GenBank accession no. NC-003112), *N. polysaccharea* NCTC11858 (GenBank accession no. X59626), *N. cinerea* NCTC10294 (GenBank accession no. X59540), *N. perflava/sicca* 1654/1659 (GenBank accession no. X76422), and *N. flavescens* NCTC8263 (GenBank accession no. M26645) were compared.

Susceptibility testing and antimicrobials

Bacteria were precultured at 35°C under a 5% CO₂ atmosphere on Chocolate II agar (Becton, Dickinson) for 20 h. MICs were determined by an agar dilution method according to the approved guidelines of the Clinical Laboratory Standards Institute,²⁴ with a GC agar base (Becton, Dickinson) containing 1% Iso VitaleX (Becton, Dickinson) and serial two-fold dilutions of antimicrobial agents. Plates were inoculated with 10⁴ colony-forming units (CFUs) per spot, and were incubated for 20 h at 35°C in a 5% CO₂ atmosphere. MICs were defined as the lowest concentration of an antimicrobial agent that inhibited growth. The following reference antimicrobial agents were used: penicillin G (Banyu Pharmaceutical, Tokyo, Japan), clavulanic acid/amoxicillin (GlaxoSmithKline, Tokyo, Japan), ceftriaxone (Nippon Roche, Tokyo, Japan), ceftoram (Toyama Chemical, Tokyo, Japan), cefodizime (Kyorin Pharmaceutical, Tokyo, Japan), cefixime (Astellas Pharma, Tokyo, Japan), azithromycin (Pfizer Japan, Tokyo, Japan), spectinomycin (Sigma Aldrich Japan, Tokyo, Japan), tetracycline (Sigma Aldrich Japan), levofloxacin (Daiichi Sankyo, Tokyo, Japan), and aztreonam (Eizai, Tokyo, Japan).

Nucleotide sequence of *N. gonorrhoeae penA* gene

Bacteria were grown at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere on modified Thayer–Martin agar for 23 h. They were then suspended in 100 μ l distilled water, heated at 100°C for 5 min, and then centrifuged at 15000 \times g for 10 min. The

full-length gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the supernatant with oligonucleotides primer F1 and R1 (Table 1) and Ex *Taq* polymerase (Takara Bio, Otsu, Japan). PCR was performed as follows: 5 min of denaturation at 94°C, 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 60°C for 0.5 min, and extension at 72°C for 2 min, concluding with a final extension at 72°C for 5 min. Sequencing was outsourced to the Dragon Genomics Center (Yokkaichi, Japan) using oligonucleotides F1, F2, F3, F4, R1, R2, R3, and R4 (Table 1). Oligonucleotides F1 to F4 and R1 to R4 were used for sequencing the forward and reverse sequences, respectively.

Homology modeling of PenA

Homology modeling of *Neisseria gonorrhoeae* PenA of wild-type strain LM306 and mosaic mutant strain NG-109 was performed using the Prime 1.5 homology modeling program.²⁵ The crystal structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x protein (PDB No. 1RP5) was chosen as the template for modeling.²⁶ Then 600ps molecular dynamics (MD) simulations of the modeling structures were performed using the AMBER 8.0 package²⁷ with a TIP3P water model.²⁸ The model structures obtained after MD simulations were minimized using the AMBER 8.0 package.

Results

Antimicrobial susceptibility and β -lactamase production

The MICs of various antimicrobial agents and β -lactamase production were determined for 47 clinical isolates in 2006. Table 2 shows the MICs at which 50% of isolates are inhibited (MIC_{50} s) and the MIC_{90} s of the various antimicrobial agents for the clinical isolates in 2001 and 2006. The MIC_{50} s of ceftriaxone, cefodizime, cefixime, and ceftazidime, and the MIC_{90} s of ceftriaxone, cefodizime, and ceftazidime for the isolates recovered in 2006 were 2–4-fold higher than those for the isolates recovered in 2001. Seventeen of the 47 strains (36.2%) isolated in 2006 showed a reduction of susceptibility to cefixime (MIC s 0.125–0.25 μ g/ml), and also exhibited a reduction of susceptibility to ceftriaxone (MIC s 0.031–0.125 μ g/ml) (Table 2). These 17 strains also showed reduced susceptibilities to penicillins and other β -lactams such as cefodizime and aztreonam. Some strains showed resistance to both levofloxacin and tetracycline. In addition, β -lactamase production was detected in 2 of 47 clinical isolates in 2006.

Table 1. Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Sequence
Primer F1	5'-TCGGGCAATACCTTTATGGTGGAAACAT-3'
Primer F2	5'-GAACGCCTGTCCGAGCTTGTC-3'
Primer F3	5'-ACAAGGCGGTTCGAATACCATC-3'
Primer F4	5'-TATACCGCACTGACGCACGAC-3'
Primer R1	5'-ACAACGGCGGGCGGGATATAACT-3'
Primer R2	5'-AACGCCGTTGACGAACCTTGC-3'
Primer R3	5'-CATCGCGCACGGGAGACGGTC-3'
Primer R4	5'-GCGAAAGTTCCAAACCTTCCT-3'

Table 2. Susceptibilities of clinical isolates of *N. gonorrhoeae* from male urethritis patients in 2001 and 2006

Antimicrobial agents ^a	2001 (n = 24) ^b			2006 (n = 47)		
	MIC_{50} (μ g/ml)	MIC_{90} (μ g/ml)	MIC range (μ g/ml)	MIC_{50} (μ g/ml)	MIC_{90} (μ g/ml)	MIC range (μ g/ml)
PCG	1	2	0.063–2	1 (2)	4 (4)	0.063–64 (1–4)
CVA/AMPC	ND	ND	ND	0.5 (1)	1 (1)	0.063–2 (0.25–2)
CTRX	0.016	0.031	\leq 0.001–0.063	0.031 (0.063)	0.063 (0.125)	0.002–0.125 (0.031–0.125)
CDZM	0.016	0.063	0.002–0.125	0.063 (0.063)	0.125 (0.125)	0.002–0.125 (0.031–0.125)
CFIX	0.016	0.25	0.004–0.25	0.063 (0.125)	0.125 (0.25)	0.004–0.25 (0.125–0.25)
CFTM	0.063	0.25	0.002–0.25	0.125 (0.5)	0.5 (1)	0.004–1 (0.125–1)
AZM	ND	ND	ND	0.25 (0.25)	0.5 (0.25)	0.008–1 (0.031–0.5)
SPCM	>8	>8	4–>8	16 (16)	16 (16)	4–16 (4–16)
TC	ND	ND	ND	1 (1)	2 (4)	0.063–16 (0.5–16)
LVFX	4	>8	0.008–>8	4 (4)	8 (16)	0.004–16 (0.5–16)
AZT	0.5	4	0.063–>8	0.5 (4)	4 (8)	0.031–8 (0.25–8)

MIC, minimum inhibitory concentration; ND, not determined

Parentetical values are MICs of 17 strains with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone isolated in 2006

^aAntimicrobial agents: PCG, penicillin G; CVA/AMPC, clavulanic acid/amoxicillin; CTRX, ceftriaxone; CDZM, cefodizime; CFIX, cefixime; CFTM, ceftazidime; AZM, azithromycin; SPCM, spectinomycin; TC, tetracycline; LVFX, levofloxacin; AZT, aztreonam

^bMIC data from Ameyama¹⁷

Amino acid sequences of PenA in strains with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone

Of the isolates in 2006, the PenA sequences of 17 strains with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone (cefixime MICs 0.125–0.25 µg/ml, ceftriaxone MICs 0.031–0.125 µg/ml), 2 β-lactamase-producing strains, and 3 cefixime-susceptible strains (cefixime MICs 0.004–0.008 µg/ml) were determined. For a detailed analysis, 8 isolates in 2006 were selected from the 22 strains described above. These 8 strains were selected on the basis of three points: their susceptibility to cefixime and ceftriaxone, their β-lactamase-producing activity, and the amino acid sequence. Of these 8 strains, 5 strains (NG-109, -110, -118, -121, and -122) were PenA mosaic strains, NG-120 was a PenA nonmosaic strain, NG-127 was a cefixime-susceptible strain, and NG-128 was a β-lactamase-producing strain. Figure 1 shows the full-length sequences of PenA of LM306 (wild-type strain),¹⁶ NG-3 (isolate in 2000),¹⁷ and NG-109, -110, -118, -120, -121, -122, -127, and -128 (isolates in 2006). The MICs of the above 8 strains isolated in 2006, and the NG-3 and ATCC19424 against various antimicrobial agents are shown in Table 3. Figure 2 shows the full-length sequences of PenA of 3 clinical strains (NG-3, -109, and -120) and those of various *Neisseria* species, including *N. meningitidis* MC58, *N. polysacchara* NCTC11858, *N. cinerea* NCTC10294, *N. perflava/sicca* 1654/1659, and *N. flavescens* NCTC8263.

As a result, strains of NG-109, -110, -118, -121, and -122 have PenA mosaic structures which are similar to those of *N. meningitidis*, *N. polysacchara*, *N. cinerea*, *N. perflava/sicca*, and *N. flavescens* (Figs. 1 and 2). These PenA mosaic structures were mainly observed in the transpeptidase domain of PenA. PenA mosaic strains (NG-109, -110, -118, -121, and -122) had almost total concordant alignment. The MICs of cefixime and ceftriaxone for the NG-109 strain were the highest (cefixime MIC 0.25 µg/ml, ceftriaxone MIC 0.125 µg/ml) among the strains isolated in 2006. The PenA sequence of the NG-109 strain corresponds to that of the NG-3 strain isolated in 2000 (cefixime MIC 0.5 µg/ml,

ceftriaxone MIC 0.063 µg/ml)¹⁷ except for the replacement of Gly-83 with Val.

The PenA sequence of NG-120, -127, and -128 had an insertion of extra aspartate (Asp-345), and 4 PenA mosaic strains (NG-3, -109, -110, and -118) had another insertion of an extra asparagine (Asn-573). In PenA nonmosaic strain NG-120, the amino acid sequence of PenA was identical to that of NG-127 except for the replacement of Ala-501 with Val and Pro-551 with Ser. The mutation of Ala-501 to Val was detected in PenA nonmosaic strain NG-120, but not in various *Neisseria* spp. In addition, β-lactamase-producing strain NG-128 did not show a PenA mosaic mutation.

The active-site serine residue (Ser-X-X-Lys) of PenA as well as the Ser-X-Asn and the Lys-Thr-Gly motifs were conserved in clinical isolates in 2006 and various *Neisseria* spp.²⁹ (Figs. 1 and 2).

Overview of structures and mapping of mutations

The *penA* monomer consists of two domains: a PBP dimerization domain (residues 71–221) and a PBP transpeptidase domain (residues 263–557).¹⁶ Figure 3 shows the stereo view of the modeled structures of *N. gonorrhoeae* PenA of the penicillin-susceptible strain LM306 and the mosaic strain isolated in 2006 (NG-109). The segment colored yellow indicates β-lactam binding site Ser-310. In Fig. 3A, the segments of Ala-501 to Val and Pro-551 to Ser mutations of nonmosaic strain NG-120 are depicted in green and light blue. This mutation of Ala-501 to Val was located near the β-lactam-binding region, but Pro-551 to Ser was not. In PenA mosaic strain NG-109, mosaic structures from other *Neisseria* spp. are depicted in red in Fig. 3B. These mutations were located in loop regions. Compared to wild-type PenA, NG-109 mosaic PenA shows substantial changes throughout the entire structure of PenA, including the PBP dimerization/transpeptidase domain linker region. In addition, the conformation of the β-lactam-binding pocket, the active site area, also changed its conformation.

Table 3. MICs of various antibiotics for *N. gonorrhoeae* ATCC19424 and clinical isolated strains

Antimicrobial agents	MIC (µg/ml)									
	ATCC19424 ^a	NG-3 ^a	NG-109	NG-118	NG-110	NG-120	NG-121	NG-122	NG-127	NG-128
PCG	0.004	2	4	2	2	1	1	1	0.063	64
CVA/AMPC	ND	ND	1	1	2	0.5	1	0.5	0.063	1
CTRX	0.00025	0.063	0.125	0.063	0.063	0.063	0.063	0.031	0.004	0.008
CDZM	0.00025	0.125	0.125	0.063	0.125	0.125	0.031	0.063	0.008	0.004
CFIX	0.001	0.5	0.25	0.25	0.125	0.125	0.125	0.125	0.008	0.016
CFTM	0.004	0.5	1	0.5	1	0.25	0.25	0.25	0.016	0.031
AZM	ND	ND	0.25	0.125	0.25	0.031	0.25	0.125	0.016	0.25
SPCM	2	4	16	16	16	8	16	16	4	16
TC	ND	ND	1	1	4	1	1	1	0.125	16
LVFX	<0.004	8	16	4	4	4	8	4	0.008	2
AZT	0.008	8	4	8	4	0.5	4	4	0.125	0.063
β-lactamase ^b	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
PenA type ^c	NM	M	M	M	M	NM	M	M	NM	NM

ND, not determined

^aMIC data from Ameyama¹⁷

^bβ-lactamase: –, negative; +, positive

^cPenA type: NM, nonmosaic; M, mosaic

	20	40	60	80	100
A. LM306	MLIKSEYKPRMLPKKEEQVKK	PMTSNGRISFVLMAMAVLFA	CLTARGLYLQTVTYNFLKEQ	GDNRIVRTQALPATRGTVSD	RNGAVLALSAPTESLFAVPK
B. NG-128	-----	-----	-----	-----	-----
C. NG-127	-----	-----	-----	-----	-----
D. NG-122	-----	-----	-----	-----	-----
E. NG-121	-----	-----	-----	-----	-----
F. NG-120	-----	-----	-----	-----	-----
G. NG-110	-----	-----	-----	-----	-----
H. NG-118	-----	-----	-----	-----	-----
I. NG-109	-----	-----	-----	-----	-----
J. NG-3	-----	-----	-----	-----	-V-
	120	140	160	180	200
A. LM306	DMKEMPSAAQLERLSELVDV	PVDVLRNKLEQKGSFIWIK	RQLDPKVAEEVKALGLENFV	FEKELKRHYPMGNLFAHVIG	FTDIDGKGQEGLELSLEDSL
B. NG-128	-----	-----	-----	-----	-----
C. NG-127	-----	-----	-----	-----	-----
D. NG-122	E-----	-----	-----	A-----S-	-----
E. NG-121	E-----	-----	-----	A-----S-	-----
F. NG-120	-----	-----	-----	-----	-----
G. NG-110	E-----	-----	-----	A-----S-	-----
H. NG-118	E-----	-----	-----	A-----S-	-----
I. NG-109	E-----	-----	-----	A-----S-	-----
J. NG-3	E-----	-----	-----	A-----S-	-----
	220	240	260	280	300
A. LM306	YGEDGAEVVLDRDRQGNIVDS	LDSRPNKAPQNGKDIILSLD	QRIQTLAYEELNKAVEYHQA	KAGTVVVL DARTGEILALAN	TPAYDPNRPGRADSEQRRNR
B. NG-128	-----	-----	-----	-----	-----
C. NG-127	-----	-----	-----	-----	-----
D. NG-122	HAGE-----E	-----	-----	-----V-	-----E-K-Q
E. NG-121	HAGE-----E	-----	-----	-----V-	-----E-K-Q
F. NG-120	-----	-----	-----	-----	-----
G. NG-110	HAGE-----E	-----	-----	-----V-	-----E-K-Q
H. NG-118	HAGE-----E	-----	-----	-----V-	-----E-K-Q
I. NG-109	HAGE-----E	-----	-----	-----V-	-----E-K-Q
J. NG-3	HAGE-----E	-----	-----	-----V-	-----E-K-Q
	320	340	359	379	399
A. LM306	AVTDMIEPGSAIKPFVIAKA	LDAGKTDLNERLNTQPYKIG	PSPVR.DTHVYPSLDVRGIM	QKSSNVGTSKLSARFGAEEM	YDFYHELIGIVRMHSGFPGE
B. NG-128	-----	-----	-----D-	-----	-----
C. NG-127	-----	-----	-----D-	-----	-----
D. NG-122	-----M--T--	-----S-V-ATDTF--L--	SAT-Q-----T-----	-----M-TPK--	-----D-V
E. NG-121	-----M--T--	-----S-V-ATDTF--L--	SAT-Q-----T-----	-----M-TPK--	-----D-V
F. NG-120	-----	-----	-----D-	-----	-----
G. NG-110	-----M--T--	-----S-V-ATDTF--L--	SAT-Q-----T-----	-----M-TPK--	-----D-V
H. NG-118	-----M--T--	-----S-V-ATDTF--L--	SAT-Q-----T-----	-----M-TPK--	-----D-V
I. NG-109	-----M--T--	-----S-V-ATDTF--L--	SAT-Q-----T-----	-----M-TPK--	-----D-V
J. NG-3	-----M--T--	-----S-V-ATDTF--L--	SAT-Q-----T-----	-----M-TPK--	-----D-V
	419	439	459	479	499
A. LM306	TAGLLRNWRRWRPIEQATMS	FGYGLQLSLLQLARAYTALT	HDGVLLPLSFEKQAVAPQGK	RIFKESTAREVRNLMVSVTE	PGGTGTAGAVDGFVDVGAKTG
B. NG-128	-----	-----	-----	-----	-----
C. NG-127	-----	-----	-----	-----	-----
D. NG-122	-----S--QK-----	-----V-----	-----E-V-----K-----	-----VI-A--KK--E-----	-----A-----
E. NG-121	-----S--QK-----	-----V-----	-----E-V-----K-----	-----VI-A--KK--E-----	-----A-----
F. NG-120	-----	-----	-----	-----	-----
G. NG-110	-----S--QK-----	-----V-----	-----E-V-----K-----	-----VI-A--KK--E-----	-----A-----
H. NG-118	-----S--QK-----	-----V-----	-----E-V-----K-----	-----VI-A--KK--E-----	-----A-----
I. NG-109	-----S--QK-----	-----V-----	-----E-V-----K-----	-----VI-A--KK--E-----	-----A-----
J. NG-3	-----S--QK-----	-----V-----	-----E-V-----K-----	-----VI-A--KK--E-----	-----A-----
	519	539	559	578	581
A. LM306	TARKFVNGRYADNKHVATFI	GFAPAKNPRVIVAVTIDEPT	AHGYYGGVVAGPPFKKIMGG	SLNILGISPTKPLT.AAAVK	TPS*
B. NG-128	-----L--V--G--	-----	-----	-----	-----*
C. NG-127	-----L--V--G--	-----	-----	-----	-----*
D. NG-122	-----L--V-Y--	-----	-----N--S--	-----	-----*
E. NG-121	-----L--V-Y--	-----	-----N--S--T--	-----	-----*
F. NG-120	<u>V</u> -L-L-V-G-	-----	-----S-	-----	-----*
G. NG-110	-----L--V-Y--	-----	-----N--S--T--V--QV--	-----V--NV--	-----*
H. NG-118	-----L--V-Y--	-----	-----N--S--T--V--QV--	-----V--NV--	-----*
I. NG-109	-----L--V-Y--	-----	-----N--S--T--V--QV--	-----V--NV--	-----*
J. NG-3	-----L--V-Y--	-----	-----N--S--T--V--QV--	-----V--NV--	-----*

Fig. 1. Amino acid sequences of PenA of *N. gonorrhoeae*. The amino acid sequences of PenA of (A) the penicillin-susceptible strain LM306, (B) the β-lactamase-producing strain NG-128 isolated in 2006, (C) the cefixime-susceptible strain NG-127, (D)–(I) strains with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone isolated in 2006, and (J) the mosaic strain with reduced susceptibility to cefixime isolated in 2000 (strain NG-3) are shown. The insertion of an extra aspartate (Asp-345) is shown in NG-120, -127, and -128, but not in other strains. The insertion of an extra asparagine (Asn-573) is shown in NG-3, -109, -110, and -118, but not in other strains. The replacement of alanine with valine (Ala-501 to Val) is shown in only NG-120. Active sites of serine residue

(Ser-X-X-Lys, Ser-X-Asn, and Lys-Thr-Gly) -conserved motifs are indicated by *underlining*. The amino acid residues colored in *red* indicate mutations from other *Neisseria* spp., *blue* indicates specific mutations which are not in other *Neisseria* spp., *purple* is a previously reported mutation of Asp-345 with reduced affinity of gonococcal PBP2 to penicillin,¹³ *green* is a specific mutation Ala-501 to Val of nonmosaic strain NG-120, and *light blue* is specific mutation Pro-551 to Ser of nonmosaic strain NG-120. *Dashes* indicate amino acid residues identical to those of LM306, *periods* are blanks, and *asterisks* are stop codons

	20	40	60	80	100
A. LM306	MLIKSEYKPRMLPKKEQVKK	PMTSNGRISFVLMAMAVLFA	CLIAAGLYLQTVTYNFKLEQ	GDNRIVRTQALPATRGTVSD	RNGAVLALSAPTESLFAVPK
B. NG-3	-----	-----	-----	-----	--V-----
C. NG-109	-----	-----	-----	-----	-----
D. NG-120	-----	-----	-----	-----	-----
E. MC58	-----	-----I-----	G-----	-----T-----	-----
F. NCTC11858
G. NCTC10294
H. 1654/1659
I. NCTC8263
	120	140	160	180	200
A. LM306	DMKEMPSAAQLERLSELVDV	PVDVLRNKLEQKQKFSFIWK	RQLDPKVAEEVKALGLENFV	FEKELKRHYPMGNLFAHVIG	FTDIDGKQEGLELSLEDSL
B. NG-3	E-----	-----	A-----	S-----	-----
C. NG-109	E-----	-----	A-----	S-----	-----
D. NG-120	-----	-----	-----	-----	-----
E. MC58	E-----	-----	-----	-----	-----
F. NCTC11858
G. NCTC10294
H. 1654/1659R-----
I. NCTC8263N-----R-----
	220	240	260	280	300
A. LM306	YGEDGAEVVLDRDQGNIVDS	LDSPRNKAPQNGKDIILSLD	QRIQTLAYEELNKAVEYHQA	KAGTVVVLADARTGEILALAN	TPAYDPNRPGRADSEQRNR
B. NG-3	HAGE-----E-----	-----	-----	-----V-----	-----E--K--Q-----
C. NG-109	HAGE-----E-----	-----	-----	-----V-----	-----E--K--Q-----
D. NG-120	-----	-----	-----	-----	-----
E. MC58	H-----	-----K-----	-----	-----	-----E--K--Q-----
F. NCTC11858	H-----	-----K-----	-----	-----	-----E--K--Q-----
G. NCTC10294	HA-E-----E-----	-----	-----	-----V-----	-----E--K--Q-----
H. 1654/1659	R---K---NK-----	---SV-K---Q-M---	---D---A---K---	---Q---V---	S---Q---Q-N---
I. NCTC8263	R---K---NK-----	---SV-K---Q-M---	---D---A---K---	---A---Q---V---	S---Q---Q-N---
	320	340	359	379	399
A. LM306	AVTDMIEPGSAIKPFVIAKA	LDAGKTDLNERLNTQPKIG	PSPVR.DTHVYPSLDVRGIM	QKSSNVGTSLKLSARFGAEEM	YDFYHELIGIVRMHSGFPGE
B. NG-3	-----M--T-----	---S--V-ATDTF--L---	SAT-Q-----T-----	-----M--TPK--	-----D--V-----
C. NG-109	-----M--T-----	---S--V-ATDTF--L---	SAT-Q-----T-----	-----M--TPK--	-----D--V-----
D. NG-120	-----	-----	D-----	-----	-----
E. MC58	-----	-----	AS-----	-----SS--	---L--S-----
F. NCTC11858	-----	-----	AS-----	-----SS--	---L--S-----
G. NCTC10294	-----	---D--N-----	AQ-----	-----SSK--	---L-----
H. 1654/1659	-----M--T-----	---S--V-ATDTF--L---	AT-Q-----T-----	-----M--TPK--	-----D--V-----
I. NCTC8263	-----M--T-----	---S--V-PTDTF--L---	AT-Q-----T-----	-----M--TPK--	-----D--V-----
	419	439	459	479	499
A. LM306	TAGLLRNWRWRPIEQATMS	FGYGLQLSLQLARAYALT	HDGVLLPLSFEKQAVAPQKG	RIFKESTAREVRNLMVSVTE	PGGTGTAGAVDGFVDGAKTG
B. NG-3	-----S--QK-----	-----V-----	---E--V---K---	---VI-A---KK--E---	A-----
C. NG-109	-----S--QK-----	-----V-----	---E--V---K---	---VI-A---KK--E---	A-----
D. NG-120	-----	-----	-----	-----	-----
E. MC58	-----	-----	V-----	-----	-----
F. NCTC11858	S--V--D--K-----	-----	-----	-----	-----
G. NCTC10294	S--A--QK-----	-----V-----	-----	---A---Q--E---	A-----
H. 1654/1659	-----S--QK-----	-----V-----	---E--V---K---	---VI-A---KK--E---	A-----
I. NCTC8263	-----S--QK-----	-----V-----	---E--V---K---	---VI-A---KK--E---	A-----I-----
	519	539	559	578	581
A. LM306	TARKFVNGRYADNKHVATFI	GFAPAKNPRVIVAVTIDEPT	AHGYGGVVAGPPFKKIMGG	SLNILGISPTKPLT.AAAVK	TPS*
B. NG-3	---L---V-Y-----	-----	---N---S---T---V---QV---	-----V-----NV---	---
C. NG-109	---L---V-Y-----	-----	---N---S---T---V---QV---	-----V-----NV---	---
D. NG-120	---V---L---V---G---	-----	-----S-----	-----	---
E. MC58	-----I-----	-----	-----	-----	---
F. NCTC11858	---L---V---G---	---R-----	---N---V---QV---	-----V-----	---
G. NCTC10294	---IK---V---G---	-----	VN-----V---QV---	-----V-----INV---	---
H. 1654/1659	---L---V---G---	-----	---N---V---EV-S---	-----V---SNT-T---	V--*
I. NCTC8263	---L---V---G---	-----	---N---V---EV-S---	-----V---SNT-T---	V--*

Fig. 2. Amino acid sequences of PenA of *N. gonorrhoeae* and other *Neisseria* spp. Amino acid sequences of PenA of (A) the penicillin-susceptible strain LM306, (B) the mosaic strain with reduced susceptibility to cefixime isolated in 2000 (strain NG-3), (C) the mosaic strain isolated in 2006 (strain NG-109), (D) the nonmosaic strain isolated in 2006 (strain NG-120), (E) *N. meningitidis* MC58, (F) *N. polysaccharea* NCTC11858, (G) *N. cinerea* NCTC10294, (H) *N. perflava/sicca*

1654/1659, and (I) *N. flavescens* NCTC8263 are shown. The active sites of serine residue (Ser-X-X-Lys, Ser-X-Asn, and Lys-Thr-Gly)-conserved motifs are indicated by *underlining*. The colored amino acid residues are indicated as in Fig. 1. *Dashes* indicate amino acid residues identical to those of LM306, *periods* are blanks, and *asterisks* are stop codons

Discussion

N. gonorrhoeae is a major pathogen isolated from patients with sexually transmitted diseases. *N. gonorrhoeae* strains with reduced susceptibility to cepheims evolved by the acquisition of β -lactamases target modifications (alteration of PBPs) and alterations of the outer membrane transport

or the enhancement of MtrCDE efflux pumps.^{19,30-32} It has been reported that in Japan, *N. gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime has been isolated from areas unrelated to the urethra, such as the pharynx.³³ It is known that the source of infection is the diversity of commercial sex, such as oral sex.

In 2001, *N. gonorrhoeae* strains with reduced susceptibility to cepheims or fluoroquinolones were isolated in

Fig. 3. The stereo view of modeled structures of *N. gonorrhoeae* PenA of (A) the penicillin-susceptible strain LM306 and (B) the mosaic strain isolated in 2006 (NG-109). A yellow-colored segment indicates β -lactam binding site Ser-310. In A, the segment colored green is an amino acid residue of Ala-501, and that colored light blue is an amino acid residue of Pro-551. In B, mutations are colored as in Fig. 1



Fukuoka, Japan.^{22,34} It was reported that these strains had multidrug resistance against such drugs as penicillin G, tetracycline, azithromycin, and ciprofloxacin. In the last few years, various guidelines for the appropriate use of antimicrobial agents against gonococcal infections have been established worldwide.^{7,11} Therefore in this study, in order to survey the tendency of such resistance, we compared the results of susceptibility testing between strains isolated in 2001 and 2006. In isolates of 2006, MIC₅₀s and MIC₉₀s against cepheids were increased by two- to four-fold, but not against quinolone, aminoglycoside, and monobactam (Table 2). These showed that the resistant level of *N. gonorrhoeae* strains with reduced susceptibility to cepheids was slightly elevated.

Our recent studies have indicated that the strains with reduced susceptibility to oral cepheids had mosaic structures in PenA which were similar to those of other *Neisseria* spp.¹⁷ In this investigation of the relations between mutations of PenA and the MICs of cepheids, the PenA sequences of wild-type strain LM306¹⁶ and various *N. gonorrhoeae* strains isolated in 2001 and 2006 were determined and compared with the other *Neisseria* spp. (Figs. 1 and 2). We performed homology modeling of *N. gonorrhoeae* PenA of wild-type strain LM306 and PenA mosaic strain NG-109 to research the impact of the mosaic mutation of PenA.

It was reported that the most significant change for reduced susceptibility against antimicrobial agents was an amino acid insertion of Asp-345 into PenA, which was shown to make a major contribution to reducing the affinity of gonococcal PBP2 to penicillin by 4–5-fold in 1990.¹³ In isolates from 2006, this insertion was found in PenA non-mosaic strain NG-120, cefixime-susceptible strain NG-127, and β -lactamase-producing strain NG-128. It is suggested that this mutation is a generality in the clinical isolates of cefixime-susceptible strains and PenA non-mosaic strains.

From a comparison of these three strains, in the PenA non-mosaic strain NG-120, two additional differences, Ala-501 to Val and Pro-551 to Ser, were found. It was reported that the mutation of Ala-501 to Val was associated with reduced susceptibility to cefixime and other oral cepheids.^{35,36} The mutation of Ala-501 to Val was located downstream of the conserved Lys-497–Thr–Gly motif. Modeling studies of PenA suggest that this mutation of Ala-501 to Val is located near the binding site, although a mutation of Pro-551 to Ser is distant (Fig. 3A). This result indicated that the mutation of Ala-501 to Val may contribute mainly to the reduced susceptibilities to penicillins and other β -lactam antimicrobial agents in PenA non-mosaic strains. In addition, it was considered that these were not horizontal transfers but