

表1 性器淋菌感染症、性器クラミジア感染症を伴ったヘテロセクシャル男性における咽頭からの淋菌、クラミジアの検出
(文献的考察)

Author	Year	Method	N	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>C. trachomatis</i>
Kojima	1994	Pharyngeal swab, Gene-probe	68	5/17 (29.4)	2/51(3.9%)
Matsumoto	2006	Pharyngeal swab, culture	18	4/18 (22.2%)	-
Hamasuna	2007	Gargle fluid, Amplicore PCR	48	-	5/48 (10.4%)
Yoda	2007 2008	Pharyngeal swab or gargle fluid, SDA method (Prob-Tec)	272	35/169 (20.7%)	7/182 (3.8%)
Takahashi	2008	Gargle fluid, SDA method (Prob-Tec)	79	13/79 (16.5%)	-
Muratani	2008	Pharyngeal swab, culture	27	2/27 (7.4%)	-
Kameoka	2009	Pharyngeal swab, TMA method (Aptima Combo2)	200	33/200 (16.5%)	22/200 (11.0%)
Uehara	2009	Pharyngeal swab or gargle fluid, TMA method (Aptima Combo2)	42	5/42 (12.9%)	1/42 (2.4%)
Total				97/552 (17.6%)	37/523 (7.1%)

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
安田 満、出口隆 岐阜大学医学部
志牟田健、中山周一 国立感染症研究所

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2002-2005年に中部地方の複数の施設で分離された淋菌330株を対象にMLST法およびNG-MAST法を用いた型別を実施した。MLST法ではST7363およびST1901が高頻度で認められた。前年度の関東地方での優先ST型と一致した。NG-MAST法の解析では、180のタイプに型別され、高解像度の解析が可能であることが示された。また、タイ分離株で報告されたTEM-135型のペニシラーゼ産生淋菌が既に国内においても分離されていることが示された。さらに、世界で初めて分離されたセフトリアキソン耐性淋菌の性状解析を行い、ST7363でありセフェキシム耐性淋菌の分子進化によることが示唆された。

A. 研究目的

淋菌感染症対策は適切な治療に基づいた感染者の治療により、感染サイクルの遮断し、新たな感染の抑止することが淋菌感染症対策の基本となる。従来、淋菌感染症の抗生剤治療は比較的容易であると考えられてきた。しかしながら、近年多様な抗生物質に対して耐性化が進み、現在では世界的に治療に用いられる薬剤は限定されてきた。

淋菌の多剤耐性化は国内のみならず、世界的に大きな公衆衛生上の問題と認識されてきている。国内外において、事実上治療に用いられる薬剤は2種、3剤に限られている。その中のひとつスペクチノマイシンに対しては、過去に耐性菌が出現した事実から、使用量が増加した場合には容易に耐性獲得することが予測されている。そのため、これまで耐性淋菌の出現が認められな

い注射用セファロスポリンであるセフトリアキソン耐性淋菌の出現は、世界的な淋菌感染症対策の大きな脅威となっている。

薬剤耐性淋菌対策のために、効果的なサーベイランスが必要であることが提唱されている (WHO consultation on STI management guidelines, Montreux, April 2008, WHO/CDC international consultation, Manila, April 2010)。しかしながら、国内において複数の施設で独立した地域サーベイランスは存在してきたが、体系的なサーベイランスは存在せず、また地域でのサーベイランスを統合したデータの蓄積はない。

薬剤耐性淋菌の拡散機構の解明がその抑止に重要である。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。得られた情報を基により効果的な対策に貢献することが期待される。

2009 年度の本研究において、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sporin 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。

2010 年度は薬剤耐性淋菌の拡散機構の解明がその抑止に重要である。淋菌の分子型別法を確立し、得られた情報を基により効果的な対策に貢献することが期待される。

また、2009 年京都市において世界で初めてセフトリアキソン耐性淋菌が性風俗産業従事者咽頭より分離され、京都市近郊におけるセフトリアキソン耐性淋菌の拡散が危惧された。その耐性機構について検討を行い、単一の遺伝子の伝播により耐性が付与されることを示した。

B. 研究方法

菌株

岐阜大学において分離、収集された淋菌菌株を TE 溶液にサスペンドし、ボイルをおこなった。熱処理菌液を遠心分離し、上清を PCR の鋳型にもちいた。2002-2005 年分離された淋菌を解析した。

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。

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 解析

制限酵素 *SpeI* 消化断片を Ito らの方法に準じて PFGE により解析した。(Ito M et al. 2004)

NG-MAST 解析

por および *tbpB* の部分配列の比較により菌株同一性を解析した (Martin IM et al. 2004)

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既報に準じて行った (Ohnishi M. et al. 2010)。

In vitro 形質転換

In vitro 形質転換はセフトリアキソン感受性株と、セフトリアキソン耐性 H041 株から PCR 法にて *penA* 配列全長を増幅した産物をインキュベーションすることで行った。

4 時間混合したのち、感受性株のセフトリアキソンに対する MIC の 4 倍濃度でトランスフォーマントを得た。得られたトランスフォーマントは平板希釈法あるいは E-test を用いて MIC を測定した。

C. 研究結果

岐阜大学淋菌コレクションの MLST 法による解析

岐阜大学によって 2002-2005 年の間に分離保存された 363 株について MLST 解析を行った。4 つの新規 MLST 型を含む計 24 種の ST 型が見いだされた (図 1)。新規型を除く 20 種の ST 型のうち、17 種は神奈川県、東京のいずれかで見いだされており、国内で分離される淋菌の MLST 型に地域性は乏しいと考えられた (図 1)。一方、24 種の MLST 型のうち半数の 12 種のみが海外で報告のある MLST 型であった。同一 ST 型が見いだされることは、淋菌の国際的な伝播を表していると考えられた (図 1)。

解析した岐阜大学コレクション株のうち ST1901 (n=164, 45.2%), ST7363 (n=95, 26.2%) の 2 つの ST 型が分離頻度の高い ST 型であった (図 1)。これら 2 つの分離頻度の高い ST 型は神奈川県および東京においても分離頻度の高い ST 型であり、地域を越えて国内で蔓延している ST 型であることが示された。

昨年度の研究では、ST7363 に属する淋菌はセフェキシム耐性およびシプロフロキサシン耐性率が高いこと、さらに、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%程度を超えていることが示されている。岐阜県を中心とした中部地方においても、これらの耐性淋菌が 2000 年以降優先型となったことを示唆した。

岐阜大学淋菌コレクションの NG-MAST 法による解析

MLST 法の系統関係を示すことが知られているが、その解像度は比較的低い。今回の解析においても多様性指数は 0.7 程度あり、菌株間の同一性を示すことは困難である。そこで、さらに解像度が高い方法である NG-MAST を用いて解析を行った。解析に用いた 330 株は、NG-MAT 法により 180 種の NG-MAST 型に分類された。多様性指数は 0.9841 と非常に高く、報告されているとおり菌株識別に用いることが可能であると考えられた。分離年ごとの多様性指数においても、0.93-0.97 と非常に高い値を示した (図 2)。

最も高頻度で分離された MLST-ST1901 を NG-MAST 法において解析することで、MLST-ST1901 菌株間の同一性を検討した。その結果、MLST-ST1901(n=152)であっても NG-MAST 法により 76 種の NG-MAST 型に分類され、多様性指数も 0.9564 と非常に解像度が高いことが示された (図 3)。分離年ごとの多様性指数に関しても、2002-2004 においては 0.92-0.94 と高い値

を示したが、2005年分離 MLST1901 菌株 (n=53)は、25種に分類されたものの多様性指数は 0.8047 と低値を示した。これは、53株中 22株が単一の NG-MAST 型 (NG-MAT2958)であったことに起因していることが示された。NG-MAST2958 株は 2004年までには分離されていなかったが、2005年に出現し中部地方の7つの異なる医療機関で分離されていたことが明らかとなった。つまり、NG-MAST2958 株による Outbreak が 2005年に起きていたことが示された。神奈川県および東京都での分離株の中でも、この NG-MAST 株が 2005年以降見いだされており、速やかに国内に蔓延したことが示唆された。

京都市で分離されたセフトリアキソン耐性淋菌の性状解析

2009年2月京都市において、セフトリアキソン耐性淋菌が世界で初めて分離された (NG-H041)。その MIC は 2 µg/mL を示すことが確認された。MLST 型は ST7363, NG-MAST 型は ST4220 であった。セフェキシム耐性淋菌の出現は、MLST-ST7363 で起こったと考えられている。そのため、セフェキシム耐性菌において、あらたな変異が加わりセフトリアキソン耐性淋菌が出現したことが想像された。そこで、*SpeI* 消化断片の PFGE 解析をおこない、H041 株と、他の MLST-ST7363 および MLST-ST1901 株との比較を行った (図4)。その結果、H041 株は他の MLST-ST7363 株と同一の PFGE パターンを示し、非常に

近縁の株であることが示された。しかしながら、NG-MAST においては同一の株は東京、神奈川、岐阜の解析かぶ 480 株のなかでは見いだされなかった。

セフェキシム耐性菌はペニシリン結合タンパク質 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、その耐性機構であるとされる。そこで、セフトリアキソン耐性淋菌 H041 の *penA* 配列を決定した。

penA-H041 遺伝子は、*penA-X* と最も類似しており、塩基配列レベルで 97.6% の相同性を示した。アミノ酸配列での比較では、12カ所の相違が認められた、3つの領域 (Region A, B, C) に集積している傾向が認められた (図5)。

そこで、この *penA-H041* がセフトリアキソン耐性に関与しているか否かを確認するために、*penA-H041* 遺伝子全長を PCR で増幅し、様々な感受性株を形質転換した。得られた形質転換体の MIC を測定した (図6)。いずれの株において、セフトリアキソン耐性は上昇し、その上昇は 16 倍から 500 倍とレシピエント株に依存していた。また、全ての株において MIC 0.25 以上に上昇しており、9 株中 6 株において MIC 2 以上の高い MIC 値を示した。つまり、*penA-H041* は、1 遺伝子でセフトリアキソン耐性をも

たらずこと、レシピエントの性状によって形質転換体の MIC の程度は変化することが示された。

penA-H041 の部分配列を PCR で増幅し、同様に感受性株に形質転換することで、耐性に必要な領域の決定を試みた。Region B は耐性に必要ではなく、Region A が不可欠であることが示された(図5)。しかしながら、Region A では *penA*-H041 全長と同等の耐性を付与するにはいたらず、Region C の関与が推測された。

D. 考察

岐阜大コレクションの解析から、神奈川および東京同様に、MLST-ST7363 および ST1901 が高頻度で分離されていた事が示された。さらに、NG-MAST 法を用いてより高解像度の識別が可能であることを示した。MLST-ST1901 を NG-MAST にて解析すると、同一 ST (NG-MAST ST2958) を示す一群が形成されることが示された。NG-MAST ST2958 は 2004 年以前の分離株は認められず、また 2005 年以降関東地方で分離された菌株に認められた。広い範囲でこのクローンが広く分布したしていたことを示した。NG-MAST 法のデータを還元することで、アウトブレイク検知が可能であると考えられる。

セフトリアキソン耐性淋菌の耐性機構が新規の変異型 *penA* (*penA*-H041) 依存的であることが示された。MLST 法および PFGE 法においてセフェキシム耐性淋菌があらたに、キメラ型 *penA* 遺伝子を獲得し

たことが強く資されている。同時に、この *penA*-H041 のみで感受性株の耐性株が得られた。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ことが示されている (Ohnishi M. et al. 2010)。この *penA*-H041 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する可能性が高く、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

時間的な淋菌株の変遷と薬剤感受性プロファイルとの関連に付いて、昨年度本研究で明らかにした。今年度は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に成功した。また、アウトブレイクの検知にも分子タイピングが有効であることが示せた。さらに、同一菌株が速やかに国内で拡散する様子を把握することにも成功した。

セフトリアキソン耐性機構について、世界で初めて明らかにした。本耐性菌は速やかに国内で蔓延する可能性は否定出来ない。さらに、1 遺伝子 (*penA*-H041) により耐性が獲得されることから、その広がりには十分に注意する必要があると考えられた。

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., 2004. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 3185-3187.
Jolley KA. 2001. Meningococcal Disease: Methods and Protocols, Human Press, New Jersey.
Martin, I. M. et al. 2004. J Infect Dis. 189:1497-1505.
Ohnishi, M., et al. 2010. Antimicrob. Agents Chemother. 54: 1060-1067.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohnishi M, Watanabe Y, Ono E., Takahashi C, Oya H, Kuroki T, Shimuta K, Okazaki N, Nakayama S, Watanabe H. Spreading of a chromosomal cefixime resistant *penA* gene among different *Neisseria gonorrhoeae* lineages. Antimicrob Agents Chemother, 54: 1060-7, 2010.
2. Ohnishi M, Ono E, Shimuta K, Watanabe H, Okamura N. Identification of TEM-135 β -lactamase in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Japan. Antimicrob Agents Chemother, 54: 3021-3023, 2010.

3. Ohnishi M, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, Nakayama S, Watanabe H, Kitawaki J. Emerging ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. **Emerging Infectious Diseases** (in press)

2. 学会発表

淋菌感染症と分子タイピング

第5回 岐阜尿路・性器感染症研究会 岐阜 2010 10月

セフトリアキソン高度耐性株の出現とその分子機構

第23回 日本性感染症学会 福岡 2010 12月

簡易的な淋菌のスクリーニング系の検討

志牟田健、中山周一、飛田収一、伊東三喜雄、藤原光文、大前利一、石川和弘、上田朋宏、大西真

第23回 日本性感染症学会 福岡 2010 12月

セファロスポリン耐性淋菌の出現とその分子機構

京滋性感染症研究会 京都 2010 12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

岐阜大コレクションの系統解析

図 1

2002-2005年

N = 363

of Sequence Type (ST) = 24

	# of Isoalte	KANAGAWA 1995-2005	TOKYO 2000-2008		
ST1901	164	●	●	UK	KOREA
ST7363	95	●	●	USA	
ST1584	17	●	●	UK	
ST7364	15	●	●		
ST1594	14	●	●	UK	IRELAND
ST7359	10	●	●		
ST7360	10	●	●	UK	
ST7358	6	●	●		
ST7371	5	●	●		
ST6722	4	●	●	Russia	
ST1590	4	●	●	UK	Taiwan
ST7819	4	●	●		
NEW2002166	3	●	●		
ST1596	2	●	●	UK	
ST1595	1	●	●	UK	USA
ST8155	1	●	●	UK	
ST8123	1	●	●	GREECE	
ST7356	1	●	●		
NEW2003084	1	●	●		
NEW2003002	1	●	●		
ST1579	1	●	●	UK	USA
ST1588	1	●	●		
NEW2004252	1	●	●		
ST7822	1	●	●		

淋菌の分子タイピング

図 2

NG-MAST: 岐阜大コレクションの解析

Year	# of types	Diversity Index	(MLST)
2002-2005	330	180	0.9841 24 types, 0.7195
2002	76	57	0.9743
2003	73	54	0.9743
2004	87	58	0.9734
2005	94	57	0.9323



Tracking gonorrhoea

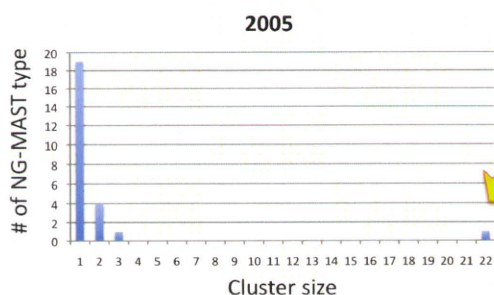
Researchers are exploring the genetic diversity of *Neisseria gonorrhoeae* to identify linked cases of gonorrhoea and help target interventions.

淋菌の分子タイピング

図 3

NG-MAST: 岐阜大コレクションMLST1901の解析

Year	# of types		Diversity Index
2002-2005	152	76	0.9564
2002	35	26	0.9388
2003	35	27	0.9437
2004	30	19	0.9289
2005	53	25	0.8047



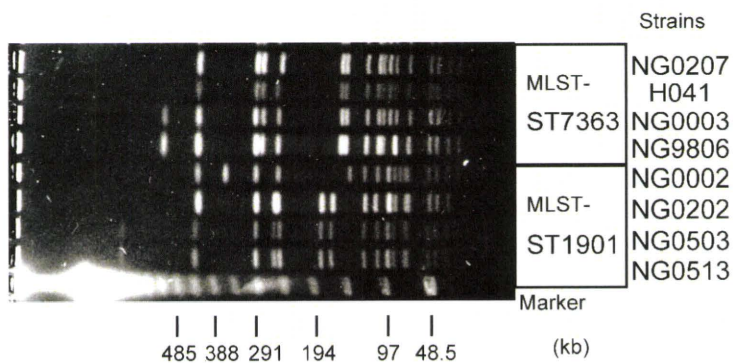
DIの低下!

遺伝的多様性低下

22株が同一の配列型
NG-MAST2958であった。

OUTBRAEK!

図 4



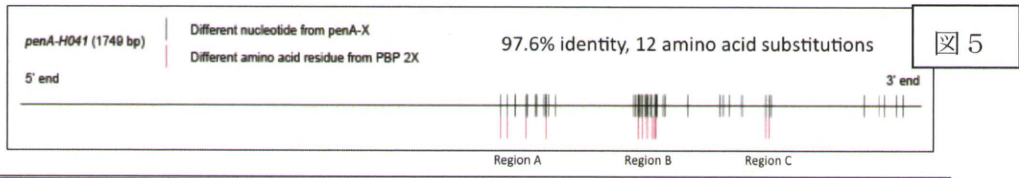
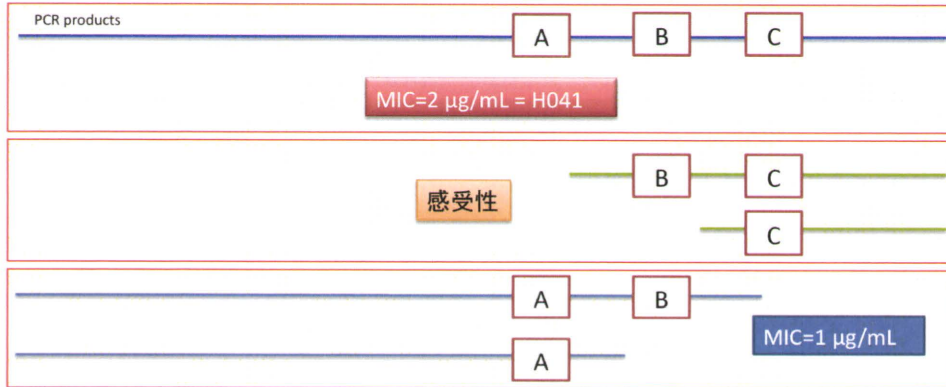


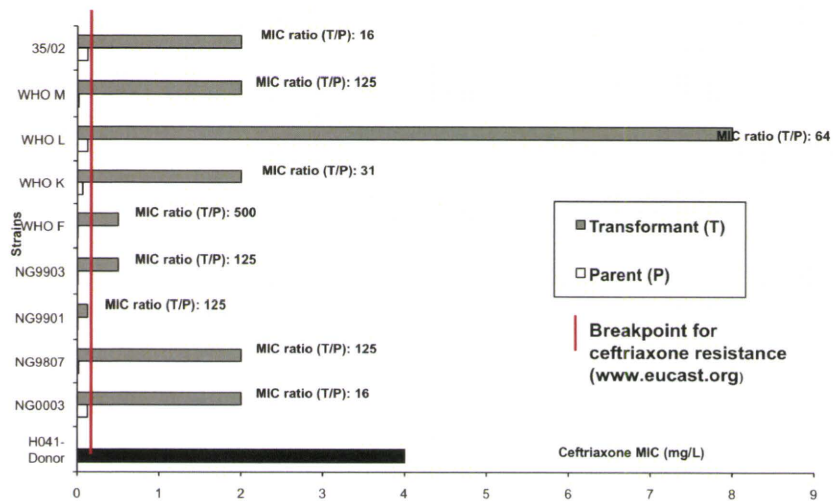
図 5

淋菌は外来のDNAを取込み染色体に組み込む能力が高い
PCRでpenA_H041遺伝子を増幅し、感受性菌と混合



penA_H041で耐性度があがる

図 6



Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
小野寺 昭一, 清田 浩, 遠藤 勝久, et.al	男子淋菌性尿道炎由来 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> の各種抗菌薬に対する感受性と cefixime 低感受性株 <i>penA</i> 遺伝子の解析	日本化学療法学会雑誌	59(1)	17-24	2011
川名 尚	周産期ウイルス感染症の診断と治療	産婦人科治療	100(2)	194-210	2010
東出 誠司, 保 坂 憲光, 太田 嘉則, et.al	新しい核酸抽出法を用いた LAMP 法による単純ヘルペスウイルスの検出	日本性感染症学会誌	21(1)	120-127	2010
川名 尚	単純ヘルペスウイルス	産科と婦人科	77	75-83	
本田まりこ	梅毒	産科と婦人科	77	34-35	
本田まりこ	梅毒血清反応(STS, FTA-ABS 法, IgM-FTA-ABS 法, TPHA 法)	日本臨牀	68 Supple6	142-146	2010
松尾 光馬, 尾 上 智彦, 伊東 秀記, et.al	単純ヘルペスウイルス感染症 (1)皮膚科領域	化学療法の領域	26(10)	25-31	2010
松尾 光馬, 伊 東 秀記, 本田 まりこ, et.al	LAMP 法によるウイルス性皮膚疾患の診断	Clinical Dermatology	64(5)	70-74	2010
本田まりこ	性器ヘルペスウイルス感染症	臨床とウイルス別冊	38(4)	284-288	2010
Katsuyuki Adachi, Kei Kawana, Terufumi Yokoyama, et.al	Oral immunization with a <i>Lactobacillus casei</i> vaccine expressing human papillomavirus(HPV) type 16 E7 is an effective strategy to induce mucosal cytotoxic lymphocytes against HPV16 E7	Vaccine	28	2810-2817	2010
Shiho Miura, Kei Kawana, Danny J. Schust, et.al	CD1d, a Sentinel Molecule Bridging Innate and Adaptive Immunity, Is Downregulated by the Human Papillomavirus(HPV) E5 Protein:a Possible Mechanism for Immune Evasion by HPV	JOURNAL OF VIROLOGY	84(22)	11614-11623	2010
濱砂 良一, 松 本 哲朗	Oral sex と性感染症	臨床とウイルス	38(4)	289-295	2010
濱砂 良一	男子尿道炎における抗菌薬の使い方	臨床泌尿器科	64(5)	313-319	2010
濱砂 良一	非淋菌性尿道炎の治療	臨床研修プラクティス	7(2)	53-55	2010
濱砂 良一	マイコプラズマ・ウレアプラズマ性器感染症の治療	日本性感染症学会誌	21(1)	35-43	2010
濱砂 良一, 松 本 哲朗	STI の治療	臨牀と研究	86(10)	62-66	2009
Makoto Ohnishi, Takeshi Saika, Shinji Hoshina, et.al	Ceftriaxone-Resistant <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , Japan	Emerging Infectious Diseases	17(1)	148-149	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Makoto Ohnishi, Yuko Watanabe, Emi Ono, et.al	Spread of a Chromosomal Cefixime-Resistant <i>penA</i> Gene among Different <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Lineages	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY	54(3)	1060-1067	2010
Makoto Ohnishi, Emi Ono, Ken Shimuta, et.al	Identification of TEM-135 β -Lactamase in Penicillinase-Producing <i>Neisseria</i> <i>gonorrhoeae</i> Strains in Japan	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY	54(7)	3021-3023	2010
余田 敬子	その他の感染症 STI	JOHNS	26(11)	1818-1824	2010
余田 敬子	淋菌およびクラミジアの咽頭感染の現 状	微研ジャーナル友	33(1)	3-8	2010
余田 敬子	オーラルセックスによる性感染症	臨床皮膚科	64(5)	169-171	2010

IV. 研究成果の刊行物・別刷

男子淋菌性尿道炎由来 *Neisseria gonorrhoeae* の各種抗菌薬に対する感受性と
cefixime 低感受性株 *penA* 遺伝子の解析

小野寺昭一¹⁾・清田 浩²⁾・遠藤 勝久³⁾・伊藤 博之⁴⁾・細部 高英⁵⁾
讃岐邦太郎³⁾・吉田 正樹¹⁾・高倉真理子⁶⁾・高畑 正裕⁶⁾

¹⁾ 東京慈恵会医科大学感染制御部*

²⁾ 東京慈恵会医科大学附属青戸病院泌尿器科

³⁾ JR 東京総合病院泌尿器科

⁴⁾ 公田クリニック

⁵⁾ 細部医院

⁶⁾ 富山化学工業株式会社総合研究所

【原著・基礎】

男子淋菌性尿道炎由来 *Neisseria gonorrhoeae* の各種抗菌薬に対する感受性と
cefixime 低感受性株 *penA* 遺伝子の解析小野寺昭一¹⁾・清田 浩²⁾・遠藤 勝久³⁾・伊藤 博之⁴⁾・細部 高英⁵⁾
讃岐邦太郎³⁾・吉田 正樹¹⁾・高倉真理子⁶⁾・高畑 正裕⁶⁾¹⁾ 東京慈恵会医科大学感染制御部*²⁾ 東京慈恵会医科大学附属青戸病院泌尿器科³⁾ JR 東京総合病院泌尿器科⁴⁾ 公田クリニック⁵⁾ 細部医院⁶⁾ 富山化学工業株式会社総合研究所

(平成 22 年 8 月 30 日受付・平成 22 年 9 月 17 日受理)

男子淋菌性尿道炎由来 *Neisseria gonorrhoeae* において、2000 年頃より cefixime (CFIX) など経口セフェム系薬に対する感受性が低下する傾向が認められ、これらの株では PBP2 (PenA) の構造遺伝子 *penA* の塩基配列がモザイク様に変異しているとの報告が多数ある。今回、東京慈恵会医科大学附属病院ならびに首都圏の関連施設で分離された新鮮臨床株 (2009 年株) の各種抗菌薬に対する薬剤感受性を測定し、1999 年、2003 年および 2006 年分離株の成績と比較するとともに、新たに確認された CFIX 低感受性株における *penA* 遺伝子の塩基配列を解析した。その結果、CFIX に対する感受性率は 2006 年まで 96.6% 以上で推移していたが、2009 年株では 47.4% に低下していた。注射セフェム系薬、ceftriaxone に対する感受性率は、いずれの年度も 100% であったが、2009 年株では MIC 累積分布の低感受性化傾向が認められた。Spectinomycin に対しては、いずれの年度も感受性率は 100% であった。Levofloxacin に対する 2009 年株の感受性率は 5.3% であり、2006 年株の 17.0% より、耐性化がさらに進行していた。2009 年分離 CFIX 低感受性株の *penA* 遺伝子はこれまでの報告と同様、他の *Neisseria* 属菌種である *Neisseria perflava/sicca* または *Neisseria flavescens* の *penA* 遺伝子に近似したモザイク変異を含むことが認められた。

今回検討した 2009 年株の日本性感染症学会のガイドラインで推奨されている薬剤に対する感受性率は 100% であったが、経口および注射セフェム系薬では低感受性化の傾向が認められ、今後も継続したサーベイランスの必要性が示唆された。

Key words: mosaic, *penA*, susceptibility, cefixime, *Neisseria gonorrhoeae*

淋菌感染症は sexually transmitted diseases (STD) として、性器クラミジア感染症と並び、臨床的に頻度の高い感染症である¹⁾。治療の中心であった、ペニシリンやテトラサイクリンに対する耐性菌の出現後は経口セフェム系薬やフルオロキノロン系薬が使用されてきた。しかしながら、1990 年代後半より、これらの薬剤に耐性を示す男子淋菌性尿道炎由来 *Neisseria gonorrhoeae* が増加し、臨床的に大きな問題になっている²⁻⁶⁾。フルオロキノロンは耐性株の著しい増加のため、日本においては淋菌感染症の治療に推奨されておらず、米国においても 2007 年、治療薬リストから除外された⁷⁾。また、2000 年頃より出現した cefixime (CFIX) 低感受性の *N. gonorrhoeae* は、現在、臨床分離株の 30% ほどに達しているとの報告もあり、これら薬剤が担ってきた治療選択肢を奪っている^{3,8)}。この

ような背景から、現在、日本の性感染症診断・治療ガイドラインで推奨されている薬剤は、注射セフェム系薬の ceftriaxone (CTRX)、cefodizime (CDZM) および注射アミノグリコシド系薬 spectinomycin (SPCM) の非経口抗菌薬 3 剤となっている¹⁾。

本邦で *N. gonorrhoeae* における経口セフェム系薬低感受性化が確認され始めた頃より、われわれはその低感受性化の要因を検討し、これらの菌では PBP2 の構造遺伝子である *penA* の塩基配列がモザイク様に変異し、PenA (PBP2 蛋白) の構成アミノ酸が変化していることを認めた^{9,10)}。経口セフェム系薬低感受性化の傾向は、これ以後、国内また海外で多数の報告がなされ、*N. gonorrhoeae* の *penA* 塩基配列がモザイク変異していることも報告されている¹¹⁻¹³⁾。また、*penA* 遺伝子のモザ

*東京都港区西新橋 3-25-8

Table 1. Oligonucleotide primer used in this study

Oligonucleotide Primer	Sequence
F1	5'-TCGGGCAATACCTTATGGTGGAAACAT-3'
F2	5'-GAACGCCTGTCCGAGCTTGTC-3'
F3	5'-ACAAGGGCGTCAATACCATC-3'
F4	5'-TATACCGCACTGACGCACGAC-3'
F5	5'-GACAGTTTGCATGCTGGAGA-3'
F6	5'-TACTGCTGGTGGGTAGATG-3'
R1	5'-ACAACGGCGGGGATATAACT-3'
R2	5'-AACCCCGTTGACGAACCTGC-3'
R3	5'-CATCGCGCACGGGAGACGGTC-3'
R4	5'-GCGAAAAGTTCCAAACCTTCCT-3'
R5	5'-CCGTCATGGGTCAAGACAGTA-3'

イク様変異より PenA のアミノ酸配列の変化は幾種かのパターンにわかれることが報告されており^{6,13,14}、このうち最も一般的なものはパターン X とされ、これまでわれわれが報告してきた、他の *Neisseria* 属菌種である *Neisseria perflava/sicca* または *Neisseria flavescens* の PenA に近似したモザイク変異を含むものである^{9,10}。

今回、2008 年 11 月～2009 年 4 月に分離された新鮮臨床株 (2009 年株) の薬剤感受性を測定し、これまでの感受性成績と比較するとともに、新たに確認された CFIX 低感受性株における PenA のアミノ酸変異を調べた。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

東京慈恵会医科大学附属病院ならびに首都圏の関連施設で 1999 年、2003 年、2006 年および 2009 年に分離された男子淋菌性尿道炎由来 *Neisseria gonorrhoeae* のそれぞれ、41 株、58 株、47 株および 38 株を用いた。臨床検体は Modified Thayer-Martin selective agar (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社 BD, 東京) に植菌し、Bio-Bag environmental chamber (type C, BD) に封入して同施設に移送した後、5% CO₂ 下で 35°C、20 時間培養した。培養後、Gram 染色、oxidase tests および catalase tests を実施した。さらに Chocolate II agar (BD) に生育させ、Gonocheck-II kit (EY Laboratories, San Mateo, CA) で同定を行った。分離した *N. gonorrhoeae* はスキムミルク中で -80°C にて保存した。これら分離株の β-lactamase 産生は β-check (Nippon Bio-Supp. Center, 東京) で確認した。

2. 使用薬剤

Penicillin G (PCG, 明治製薬株式会社, 東京), clavulanic acid/amoxicillin (CVA/AMPC, グラクソ・スミスクライン株式会社, 東京), cefixime (CFIX, アステラス製薬株式会社, 東京), ceftoram (CFTM, 富山化学工業株式会社, 東京), ceftriaxone (CTRX, 中外製薬株式会社, 東京), cefodizime (CDZM, 杏林製薬株式会社, 東京), aztreonam (AZT, エーザイ株式会社, 東京), spectinomycin (SPCM, シグマ アルドリッチ ジャパン株式会

社, 東京), levofloxacin (LVFX, 第一三共株式会社, 東京), azithromycin (AZM, ファイザー株式会社, 東京), tetracycline (TC, シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社) を用いた。

3. 薬剤感受性の測定

各年度臨床分離株を Chocolate II agar 平板培地に植菌し、5% CO₂ 下で 35°C、20 時間培養した後、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のガイドライン¹⁵に基づき、1% Iso VitaleX (BD) を含む GC agar base (BD) を用いた寒天平板希釈法にて MIC を測定した。接種菌量は 10¹ colony forming unit (CFU) /spot とし、5% CO₂ インキュベーターで 35°C、20 時間培養し、肉眼的に生育の認められない最小濃度を MIC とした。また、CLSI の MIC Interpretive Standards¹⁶に基づき、各年度、各薬剤感受性率を算出した。なお、LVFX については設定がないため、ofloxacin (OFLX) の MIC Interpretive Standards を参考に設定した。

4. CFIX 低感受性 *N. gonorrhoeae* の penA 遺伝子の解析

2009 年分離の CFIX 低感受性 (MIC : 0.5 μg/mL および 1 μg/mL) の 10 株 (NG-130, 132, 135, 136, 137, 143, 146, 142, 139, 148) について penA 遺伝子を解析した。Modified Thayer-Martin Agar 上で 23 時間、35°C 5% CO₂ 下で培養した。生育した菌を 100 μL の溶菌液 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% triton-X) に懸濁させた後、100°C 10 分加熱後 15,000×g で 10 分間遠心し、その上清を PCR の template とした。penA 遺伝子の全長を、これまでの報告^{9,10}に基づき、oligonucleotides primer の F1 (forward sequences) と R1 (reverse sequences) (Table 1)、および Ex Taq polymerase (タカラバイオ株式会社, 大津) を用い PCR で増幅した。PCR は 94°C、2 分間の変性の後、94°C、30 秒の変性、55°C、30 秒のアニーリング、72°C、3 分間の伸長を 30 サイクル行った後、最後に 72°C、1 分間の伸長の条件で行った。増幅された penA 遺伝子の解析は oligonucleotides の F1, F2, F3, F4, F5, F6 および R1, R2, R3, R4, R5

Table 2. Antibacterial activity of agents against clinical *N. gonorrhoeae* isolates

Antibacterial agent	1999 (n = 41)			2003 (n = 58)		
	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	ND	ND	ND	1	4	0.03-4
CVA/AMPC	ND	ND	ND	0.5	1	0.03-2
CFIX	0.008	0.03	0.002-0.125	0.03	0.5	0.002-0.5
CFTM	0.06	0.125	0.002-0.5	0.125	0.5	0.008-1
CTRX	0.008	0.015	\leq 0.001-0.06	0.03	0.125	0.002-0.125
CDZM	0.03	0.06	0.002-0.25	0.03	0.125	0.002-0.125
AZT	0.25	0.5	0.06-8	0.25	4	0.03-8
SPCM	8	16	4-16	8	16	2-16
LVFX	0.5	8	0.002-16	4	8	0.004-16
AZM	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TC	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Antibacterial agent	2006 (n = 47)			2009 (n = 38)		
	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	4	0.06-64	1	4	0.06-4
CVA/AMPC	0.5	1	0.06-2	1	2	0.125-4
CFIX	0.06	0.125	0.004-0.25	0.5	0.5	0.008-1
CFTM	0.125	0.5	0.004-1	0.25	0.5	0.004-1
CTRX	0.03	0.06	0.002-0.125	0.06	0.125	0.004-0.25
CDZM	0.06	0.125	0.002-0.125	0.06	0.25	0.004-0.5
AZT	0.5	4	0.031-8	4	16	0.125-16
SPCM	16	16	4-16	16	16	8-32
LVFX	4	8	0.004-16	8	8	0.002-16
AZM	0.25	0.5	0.008-1	0.25	1	0.008-8
TC	1	2	0.06-16	1	4	0.125-32

Shading shows antibacterial activity of oral and parenteral cephem antibiotics and monobactam antibiotic.

Table 3. Percentage of susceptible strains of antibacterial agents in clinical *N. gonorrhoeae* isolates

Antibacterial agent	Breakpoint MIC (μ g/ml) ^a	Percentage of susceptible strains in			
		1999 (41) ^b	2003 (58)	2006 (47)	2009 (38)
PCG	0.06	N.D.	1.7	4.3	10.5
CFIX	0.25	100	96.6	100	47.4
CTRX	0.25	100	100	100	100
SPCM	32	100	100	100	100
LVFX ^c	0.125	41.5	17.2	17.0	5.3

^a: CLSI, ^b: No. of strains, ^c: Assumed from OFIX breakpoint MIC

(Table 1) を用い^{9,10)}, Dragon Genomics Center (タカラバイオ株式会社, 四日市) に行った。遺伝子の解析結果はアミノ酸に置換し, *N. gonorrhoeae* LM306 (ペニシリン感受性株: GenBank accession no. M32091), NG-3 (2001年に分離されたCFIX低感受性株: GenBank accession no. AB071984) および NG-122 (2006年に分離されたCFIX低感受性株) の PenA と比較した。また, 他の *Neisseria* 属である *N. perflava* sicca 1654/1659 (GenBank accession no. X76422), *N. flavescens* NCTC 8263 (GenBank accession no. M26645), *Neisseria cinerea* NCTC 10294 (GenBank accession no. X59540) の PenA

との比較を行った。

II. 結 果

1. 薬剤感受性

1999年から3~4年間間隔の1999年, 2003年, 2006年および2009年の各年度臨床分離株における薬剤感受性を Table 2 に, また, 各薬剤に対する感受性率を Table 3 に示す。なお, β -lactamase 産生株の割合は1999年: 1/41株: 2.4%, 2003年: 3/58株: 5.2%, 2006年: 2/47株: 4.3%, 2009年: 0/38株: 0%であった。

1999年にはすでにキノロン耐性菌の存在が認められ, LVFX の MIC₉₀ 値は 8 μ g/ml と高かった。一方, 経口セ



Fig. 1. Amino acid sequences of *N. gonorrhoeae* PenA with reduced cefixime susceptibility isolated in 2009 and before. LM306: penicillin-susceptible strain, NG-142, NG-139, NG-130 and NG-132 (isolated in 2009), NG-122 (isolated in 2006) and NG-3 (isolated in 2001): the mosaic-like strain with reduced cefixime susceptibility. Active sites of serine residue (SXXX, SXN and KTG)-conserved motifs are indicated by underlining. Dashes indicate amino acid residues identical to those of LM306. Asterisks are stop codons.

フェム系薬のCFIX, CFTMの1999年分離株に対するMIC₅₀, MIC₉₀値はともに低く(Table 2), CFIXに対する感受性率は100%であった(Table 3)。また, 注射セフェム系薬のCTR Xに対する感受性率も100%であったが, モノバクタム系注射薬AZTに対しては, すでに感受性の低い株が含まれていた(Tables 2, 3)。2003年になるといずれのβ-ラクタム系薬もMIC rangeの高濃度域への拡がりやMIC₉₀値の上昇が認められた。また, LVFXではMIC₅₀値のさらなる上昇が認められた。2006年分離株の感受性は2003年分離株と比較していずれの薬剤も大きな感受性の低下は認められなかった。しかし, 2009年株の感受性は2006年度と比較すると, 経口セフェム系薬(CFIX)および注射セフェム系薬(CTR X, CDZM)における感受性の低下がみられた。即ち, CFIX, CDZMのMIC₉₀値がそれぞれ4倍および2倍に, CFIX, CTR X, CDZMのMIC range上限値がそれぞれ4倍, 2倍, 4倍に増大していた(Table 2)。経口セフェム系薬, CFIXに対する2006年までの感受性率は96.6%以上で推移していたが, 2009年分離株では47.4%に低下した(Table 3)。2009年分離株に対して, 注射セフェム系薬, CTR X

はMIC分布で低感受性化傾向が認められるものの, 感受性率は依然100%であった。SPCMに対しては1999年から2009年までの分離株で大きな感受性の変化は認められず, 感受性率は100%であり, SPCM耐性菌の出現は当該施設では認められなかった。LVFXに対しては感受性率が1999年には41.5%であったが, 年々低下し, 2009年度は5.3%と耐性化がさらに進行していた(Table 3)。

2. CFIX低感受性*N. gonorrhoeae*のPenA蛋白の変異と薬剤感受性

2009年分離CFIX低感受性10株のPenAはすべての株でモザイク様変異が認められた。変異アミノ酸の種類はほとんど同一であったが, A549以降にモザイク変異がないもの(I型)とあるもの(II型)の違いで2パターンに分かれた。10株中3株(NG-142, 139, 148)がI型, 7株(NG-130, 132, 135, 136, 137, 143, 146)がII型であった。Fig. 1に今回分離された株のうち, I型のNG-142, NG-139, II型のNG-130, NG-132におけるアミノ酸配列を示す。

I型は2008年にわれわれが報告したNG-122(2006年

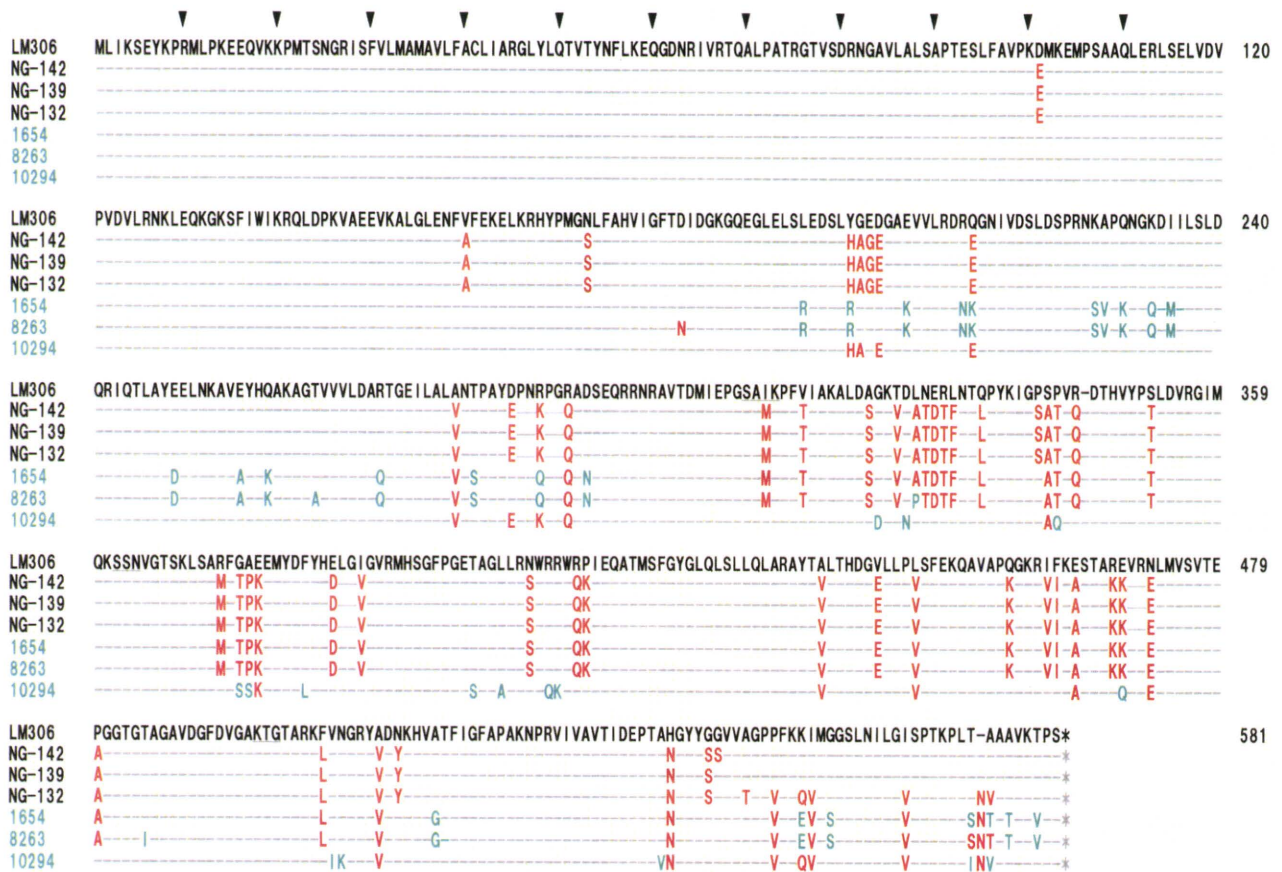


Fig. 2. Amino acid sequences of *N. gonorrhoeae* and other *Neisseria* spp. PenA.

LM306: penicillin-susceptible strain, NG-142, NG-139 and NG-132: the mosaic-like strain with reduced cefixime susceptibility isolated in 2009, 1654: *N. perflava/sicca* 1654/1659, 8263: *N. flavescens* NCTC 8263, 10294: *N. cinerea* NCTC 10294. Active sites of serine residue (SXXK, SXN, and KTG)-conserved motifs are indicated by underlining. Dashes indicate amino acid residues identical to those of LM306. Asterisks are stop codons.

分離菌), II型は2002年に報告したCFIX低感受性株NG-3(2001年分離菌)とほぼ同一のアミノ酸変異であった(Fig. 1)^{9,10)}。なお, II型のNG-130は他の9株でみられたQ214Eの変異がなく, 感受性株と同じアミノ酸(Q)を保有していた。G545S変異はすべての株にみられたが, I型の1株, NG-142ではさらに, これまでに報告のないG546Sの変異が認められた(Fig. 1, GenBank Accession number: AB536877として登録済)。これらCFIX低感受性株のPenAは他の*Neisseria*属の*N. perflava/sicca* 1654/1659(GenBank Accession number: X76422), あるいは*N. flavescens* NCTC 8263(GenBank Accession number: M26645)のPenAに近似しており, いずれの株にも活性中心近傍に*N. gonorrhoeae*には認められない2つのアミノ酸(I312MとV316T)の変異が認められた(Fig. 2)。

PenAの解析を行ったCFIX低感受性10株はすべてLVFXに対して耐性であった(Table 4)。また, CFIXのMIC値は0.5 μg/mLあるいは1 μg/mLであり, セフェム薬感受性のATCC 19424株におけるMIC値(0.001 μg/mL)と比べ, 感受性は1/512-1/1024に低下し

た。これらに対して, CTRXのMIC値は0.03~0.12 μg/mLであり, 比較的良好な抗菌活性を保有していたが, ATCC 19424株のMIC値(0.00025 μg/mL)に比べ感受性は1/128-1/512に低下した。さらに, これまでの報告にみられないG546S変異が認められたNG-142株では, 検討した経口および注射セフェムの4薬剤に対し, 他の9株のセフェム薬低感受性株よりもさらに1-1/16の低感受性を示した(Table 4)。

III. 考 察

1999~2001年当時, 男子尿道炎患者から分離した*N. gonorrhoeae*のキノロン系薬に対する高度耐性化が臨床的に大きな問題になっており, その原因は標的酵素ParC, GyrAの変異であることも報告されていた¹⁾。また, 同時期, 淋菌感染症治療の重要な選択肢である経口セフェム系薬に対しても, 低感受性を示す*N. gonorrhoeae*の出現が認められ始めていた^{2,3)}。東京慈恵会医科大学附属病院ならびに首都圏の関連施設で1999年より開始したわれわれのサーベイランスの成績では, 1999年のCFIXのMIC₉₀値ならびにMIC rangeはそれぞれ0.03 μg/mL, 0.002~0.125 μg/mLであるのに対し, 2003年で