

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

総合研究報告書

「性感染症に関する予防、治療の体系化に関する研究」

男子淋菌性尿道炎由来淋菌に対する各種抗菌薬の感受性

（1999年～2011年分離株の比較）の検討

主任研究者 小野寺昭一（東京慈恵会医科大学感染制御部教授）

研究要旨

わが国において、淋菌感染症は1992年以降減少傾向が続いていたが、1996年頃より増加傾向に転じたものの、2003年頃より再び減少傾向が続いている。しかし耐性淋菌の増加が問題となっており、今後、再び増加することが懸念される。我々は、1999年より2010年までに東京慈恵会医科大学附属病院ならびに首都圏の関連病院にて検出された、男子淋菌性尿道炎患者由来の淋菌臨床分離株の各種薬剤に対する感受性を調査し、その動向を検討してきた。今回、さらに2011年に検出された淋菌臨床分離株の各種薬剤に対する感受性を調査しその動向を検討した。その結果、第一選択薬であり注射剤である ceftriaxone（以下 CTRX）、cefodizime（以下 CDZM）、spectinomycin（以下 SPCM）に対する感受性率は2010年までと同様に、2011年も変化は認めず100%であった。一方、CTRXとCDZMのMIC累積分布では2006年まで徐々に耐性化が続いていたが、2007年では逆にMICの低下が認められ、わずかではあるが感受性への移動が認められた。更に2008年もこの傾向が続き、感受性の回復が認められた。しかし、2010年では1999年の検討開始以来、最も耐性化傾向へのシフトが強まった。この耐性化傾向が今後も更に続くことが危惧されたが、2011年では感受性方向へのシフトに変化した。また内服薬である cefixime（以下 CFIX）、cefteramp pivoxil（以下 CFTM）は、2010年の感受性率はCFIXで96.7%であったが、CFTMでは63.3%と低下した。しかし、2011年ではCFIXで100%、CFTMでは77.8%と回復した。MIC累積分布では2010年まで共に、耐性化へのシフトが強まっていたが、2011年では注射剤セフェムと同様に感受性方向へのシフトに変化した。一方、penicillin G（以下 PCG）、clavulanic acid/amoxicillin（以下 CVA/AMPC）では2006年以降、感受性率は10%台以下で推移し、2011年では共に0%であった。MIC累積分布でも耐性化傾向が続いているが2003年以降大きな変化は認められなかった。levofloxacin（以下 LVFX）は、感受性率では2007年以降、7～20%台で推移していたが、2011年では感受性方向へのシフトに変化し、二峰性のパターンが強くなった。azithromycin（以下 AZM）は2004年からMIC累積分布のみ検討してきたが、年により変化し、一定の傾向は認められなかった。今後もサーベイランスの必要性が認められた。

研究協力者：

遠藤勝久 JR 東京総合病院泌尿器科部長

清田 浩 東京慈恵会医科大学泌尿器科
助教授

A. 研究目的

1999 年より 2010 年までに東京慈恵会医科大学付属病院ならびに首都圏の関連病院にて検出された、男子淋菌性尿道炎患者由来の淋菌臨床分離株の各種薬剤に対する感受性を調査し、その動向を確認、検討した。今回、さらに 2011 年に分離された臨床分離株を追加し、1999 年からの動向を検討した。

B. 研究方法

東京慈恵会医科大学付属病院ならびに首都圏の関連病院を受診した男子淋菌性尿道炎患者由来の *Neisseria gonorrhoeae* 計 351 株 (1999 年：41 株、2000 年：57 株、2001 年：24 株、2003 年：58 株、2004 年：101 株、2006 年：47 株、2007 年：23 株、2008 年：18 株、2009 年：38 株、2010 年：36 株、2011 年：27 株) を対象として、各種薬剤に対する感受性を調査し、その動向を確認、検討した。

β -lactamase 活性はニトロセフィン法を用いて測定し、CFIX、CFTM、CTRX、CDZM、SPCM、LVFX、PCG、CVA/AMPC、AZM に対する感受性を CLSI に準じて測定した。各薬剤に対する感受性率では、それぞれの薬剤の break point を CFIX ($\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$)、CFTM ($\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$)、CTRX ($\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$)、CDZM ($\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$)、SPCM ($\leq 32 \mu\text{g/ml}$)、LVFX ($\leq 0.125 \mu\text{g/ml}$)、PCG ($\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$)、CVA/AMPC ($\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$) とした。

(倫理面への配慮)

一般外来患者の尿および尿道分泌物からの淋菌の分離および感受性検査は、治療を進めるうえで不可欠の検査であり、一般的に外来診療で通常に行われているものであるため、倫理面では問題はないと判断した。

C. 研究結果

(図 1) に示すように、 β -lactamase 産生菌は 1999 年に 41 株中 1 株 (2.4%)、2003 年に 58 株中 3 株 (5.2%)、2004 年に 101 株中 5 株 (5.0%)、2006 年に 47 株中 2 株 (4.3%)、2007 年では 23 株中 0 株 (0%)、2008 年では 18 株中 0 株 (0%)、2009 年では 38 株中 0 株 (0%)、2010 年では 36 株中 0 株 (0%)、そして 2011 年では 27 株中 3 株 (11.1%) であった。

ペニシリン系薬の PCG、CVA/AMPC に対する感受性率は、2006 年以降、10% 台以下で推移し、2011 年では共に 0% であった (図 2、図 3)。一方、MIC 累積分布は 2003 年以降大きな変化は認められなかった (図 2、図 3)。

セフェム系経口薬の 2011 年の感受性率は、CFIX では 100%、CFTM では 77.8% と回復した (図 4、図 5)。MIC 累積分布では 2010 年まで共に耐性化へのシフトが続いていたが、2011 年では感受性方向へのシフトに変化し、軽度の二峰性パターンを示した (図 4、図 5)。

現在の淋菌性尿道炎の推奨治療薬であり注射剤である CTRX、CDZM および SPCM に対する感受性率は 1999 年以降 100% が続いて

おり、2011年も共に100%であった(図6、図7、図8)。MIC累積分布ではCTR、CDZMの2剤が1999年以降徐々に耐性化へのシフトが続いていたが、2007年、2008年では、わずかに感受性への変化が認められた。2009年、2010年では再び耐性化の方向へシフトしたが、2011年では再び感受性方向へのシフトに変化し、軽度の二峰性パターンを示した(図6、図7)。

SPCMではMIC累積分布に大きな変化はなかった(図8)。

キノロン系薬のLVFXに対する感受性率において、検討を開始した時より低く、2001年以降7~30%台で推移していた。MIC累積分布では1999年以降耐性化が続いていたが、2011年では感受性方向へのシフトに変化したが、二峰性パターンを示した(図9)。

AZMは2004年からMIC累積分布のみ検討してきたが、年により変化し、一定の傾向は認められなかった(図10)。

D. 考察

2011年度のβ-ラクタマーゼ産生株は3株であった。

2011年度ではセフェム系抗菌薬に対し、経口剤(CFIX、CFTM)では感受性率に回復傾向が認められ、MIC累積分布でも感受性方向へのシフトが認められたが、二峰性のパターンを示した。

注射剤(CTR、CDZM)では、感受性率は100%が続いていた。MIC累積分布では全株Break point以下が続いており、2010年まで緩徐に続いていた耐性方向へのシフトが、感受性方向へのシフトに変化したが、経口剤と同様に軽度の二峰性のパターンを示した。

ペニシリン系抗菌薬に対し、2011年度でも感受性率は低く、MIC累積分布でも2001年から2011年まで大きな変化は認められなかった。

SPCMでは、感受性率は100%が続き、MIC累積分布でも全株Break point以下が続いており、2011年でも耐性化傾向は認められなかった。

LVFXに対しては、2011年でも感受性率、MIC累積分布共に回復傾向に変化したが、二峰性のパターンが強くなった。

E. 結論

- ① 2011年ではβ-lactamase産生株は3株であった。
- ② ペニシリン系抗菌薬に対する感受性率は2006年以降、10%台以下で推移し、2011年では共に0%であった。一方、MIC累積分布は2003年以降大きな変化は認められなかった。
- ③ セフェム系抗菌薬に対する感受性率では、注射剤であるCTR、CDZMでは2011年も100%であった。一方、経口薬であるCFIX、CFTM共に回復傾向に変化した。
- ④ セフェム系抗菌薬に対するMIC累積分布では、注射剤、経口剤共に1999年から2006年まで徐々に耐性化への移動が続いていたが、2007年、2008年と、わずかではあるが、感受性へ移動する傾向が認められた。2009年、2010年になり、再び耐性化にシフトしたが、2011年では再び感受性方向へのシフトに変化し、軽度の二峰性パターンを示した。
- ⑤ SPCMでは感受性率は100%で推移し、MIC累積分布でも変化は認めなかった。
- ⑥ 現在の淋菌性尿道炎の推奨治療薬であ

る注射剤 CTRX、CDZM の感受性の回復傾向が認められたものの、2010 年まで耐性化方向へのシフトが続いていたことを考えると、今後も継続したサーベイランスの必要性が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 遠藤勝久、小野寺昭一

淋菌感染症に対する薬物療法
医薬ジャーナル 40(3):86-91, 2004

2) 各務 裕、遠藤勝久、鈴木博雄、清田 浩、小野寺昭一

男子淋菌性尿道炎由来淋菌の各種抗菌薬に対する感受性
—1999~2004 年分離株の比較—
日本化学療法学会雑誌 53(8):
483-487, 2005

3) S. Onodera, H. Kiyota, K. Endo,
H. Suzuki, T. Hosobe, T. Takahashi,
S. Egawa, I. Kobayashi
Enhancement of antimicrobial
activities of ceftazidime or
clavulanic acid/amoxicillin
against cefixime-resistant
Neisseria gonorrhoeae in the
presence clarithromycin or
azithromycin
J Infect Chemother 12:207-209,
2006

4) K. Osaka, T. Takakura, K. Narukawa, M. Takahata, K. Endo, H. Kiyota, S. Onodera

Analysis of amino acid sequences
of penicillin-binding protein 2 in
clinical isolates *Neisseria*

gonorrhoeae with reduced
susceptibility to cefixime and
ceftriaxone

J Infect Chemother 14:195-203,
2008

5) 遠藤勝久

尿路・性器の炎症性疾患[淋菌性尿道炎]

臨床泌尿器科 62(4):90-94, 2008

6) 遠藤勝久、小野寺昭一

性感染症(淋菌)
KEY WORD 感染症 第2版
先端医学社 84-85, 2008

7) 小野寺昭一、清田 浩、遠藤勝久、 伊藤博之、細部高英、讃岐邦太郎、 吉田正樹、高倉真理子、高畑正裕

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

日本化学療法学会雑誌 59(1):
17-24, 2011

8) 遠藤勝久、小野寺昭一、清田 浩、 鈴木博雄、細部高英、成岡健人、讃 岐邦太郎

男子淋菌性尿道炎由来淋菌の各種抗
菌薬に対する感受性
—1999~2004 年分離株の比較—
日本化学療法学会雑誌 59(3):
308-312, 2011

2. 学会発表

1) 遠藤勝久、小野寺昭一

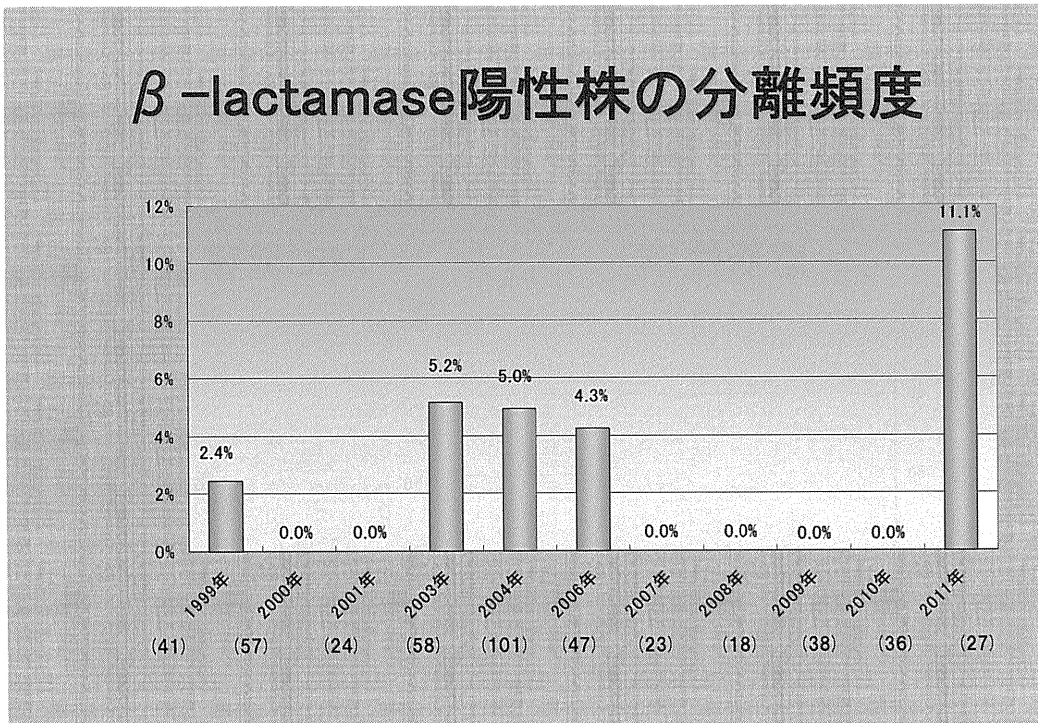
Neisseria gonorrhoeae の経口セフ
テム薬耐性について
第7回東京性感染症(STD)研究会

- 2003年3月13日 東京
- 2) 遠藤勝久、鈴木博雄、清田 浩、小野寺昭一
男子淋菌性尿道炎由来淋菌に対する各種抗菌薬の感受性
—1999～2003年分離株の比較—
第16回日本性感染症学会学術大会
2003年12月6日 長野
- 3) 各務 裕、遠藤勝久、鈴木博雄、清田 浩、小野寺昭一
男子淋菌性尿道炎由来淋菌に対する各種抗菌薬の感受性
—1999～2004年分離株の比較—
第17回日本性感染症学会学術大会
2004年12月5日 東京
- 4) 遠藤勝久、鈴木博雄、各務 裕、清田 浩、小野寺昭一
セフェム低感受性 *N. gonorrhoeae* に対するマクロライド+ β -ラクタム薬の併用効果の検討
第18回日本性感染症学会学術大会
2005年12月3日 北九州
- 5) 遠藤勝久、小野寺昭一
シンポジウム「性感染症の現状と対策」
薬剤耐性淋菌感染症の現状
第94回日本泌尿器科学会総会
2006年4月12日 福岡
- 6) 遠藤勝久、小野寺昭一
シンポジウム「STDの現状と今後の展望」
尿道炎の治療：治療の落とし穴は何か？
第71回日本泌尿器科学会東部総会
2006年10月20日 東京
- 7) 遠藤勝久、小野寺昭一、清田浩
Enhancement of antimicrobial activities of cefteram or clavulanic acid/amoxicillin against cefixime-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in the presence of clarithromycin or azithromycin
10th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases
2006年12月5日 福岡
- 8) 遠藤勝久、小野寺昭一、清田浩
男子淋菌性尿道炎由来淋菌に対する各種抗菌薬の感受性（2006年次報告）
第19回日本性感染症学会学術大会
2006年12月9日 金沢
- 9) 遠藤勝久、小野寺昭一、清田浩
シンポジウム「性感染症の動向—変貌する尿道炎—」
薬剤耐性淋菌への対応：単独療法と併用療法
第95回日本泌尿器科学会総会
2007年4月17日 神戸
- 10) 遠藤勝久、小野寺昭一、清田浩
男子淋菌性尿道炎由来淋菌に対する各種抗菌薬の感受性—1999～2006年分離株の比較—
第55回日本化学療法学会総会
2007年6月1日 仙台
- 11) 遠藤勝久、小野寺昭一、清田浩
男子淋菌性尿道炎に対するセフェラムピボキシル、クラリスロマイシン3日間併用療法の有効性および安全性の検討
第20回日本性感染症学会学術大会

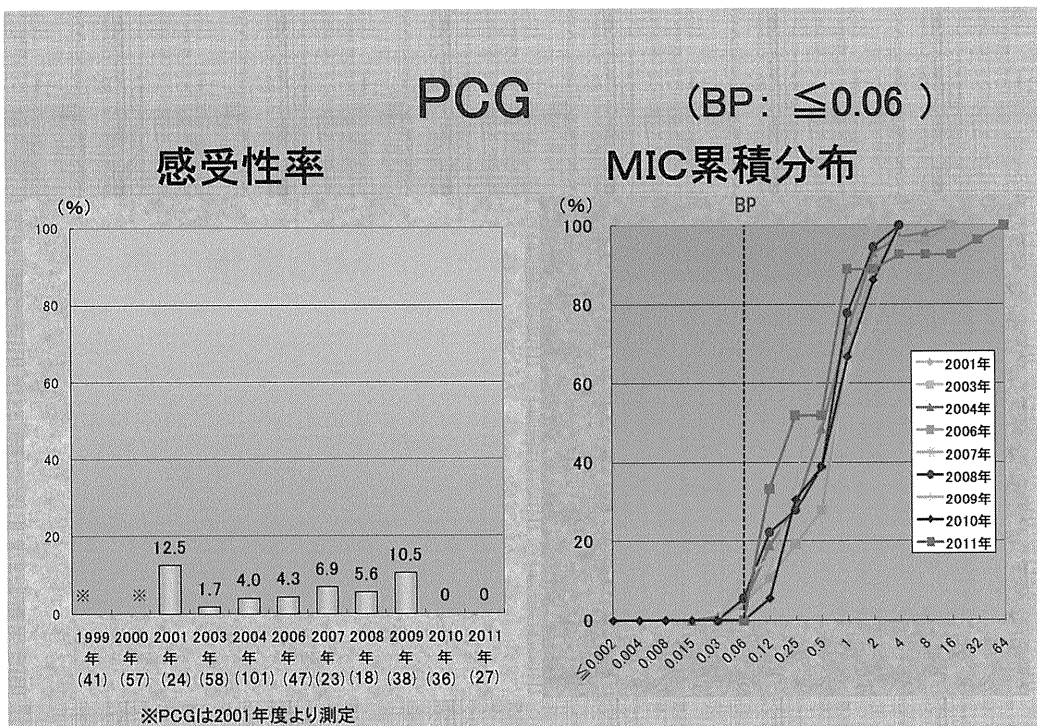
- 2007年12月1日 東京
- 12) 遠藤勝久、清田 浩、小野寺昭一
最近の耐性淋菌について
第8回東京性感染症（STD）研究会
2008年5月31日 東京
- 13) 遠藤勝久、清田 浩、颯川 晋、小野寺昭一、東京 STD 懇話会
男子淋菌性尿道炎に対するセフトラムピボキシル、クラリスロマイシン
3日間併用療法の有効性および安全性の検討
第56回日本化学療法学会総会
2008年6月6・7日 岡山
- 14) 遠藤勝久、清田 浩、鈴木博雄、細部高英、成岡健人、小野寺昭一、
男子淋菌性尿道炎由来淋菌に対する
各種抗菌薬の感受性－1999～2008年
分離株の比較－
第21回日本性感染症学会学術大会
2008年12月6・7日 東京
- 15) 遠藤勝久、讃岐邦太郎、清田 浩、
小野寺昭一、
男子淋菌性尿道炎由来淋菌に対する
各種抗菌薬の感受性－1999～2009年
分離株の比較－
第9回東京性感染症（STD）研究会
2009年9月26日 東京
- 16) 遠藤勝久、讃岐邦太郎、清田 浩、
鈴木博雄、細部高英、小野寺昭一、
男子淋菌性尿道炎由来淋菌に対する
各種抗菌薬の感受性－1999～2009年
分離株の比較－
第58回日本感染症学会東日本地方
会学術集会・第56回日本化学療法学
会東日本支部総会合同学会
2009年10月31日 東京
- 17) 遠藤勝久、讃岐邦太郎、清田 浩、
鈴木博雄、細部高英、小野寺昭一、
男子淋菌性尿道炎由来淋菌に対する
各種抗菌薬の感受性と CFIX 低感受
性株 penA 遺伝子の解析
第22回日本性感染症学会学術大会
2009年12月12日 京都
- 18) 遠藤勝久、讃岐邦太郎、清田 浩、
鈴木博雄、細部高英、小野寺昭一、
男子淋菌性尿道炎由来淋菌に対する
各種抗菌薬の感受性と CTRX 低感受
性株 penA 遺伝子の解析
第58回日本化学療法学会総会
2010年6月4日 長崎
- 19) 遠藤勝久、讃岐邦太郎、清田 浩、
鈴木博雄、細部高英、小野寺昭一、
男子淋菌性尿道炎由来淋菌に対する
各種抗菌薬の感受性－1999～2010年
分離株の比較－
第22回日本性感染症学会学術大会
2010年12月11日 福岡
- 20) 遠藤勝久、讃岐邦太郎、成岡健人、
清田 浩、鈴木博雄、細部高英、小
野寺昭一、
男子淋菌性尿道炎由来淋菌に対する
各種抗菌薬の感受性－1999～2011
年分離株の比較－
第23回日本性感染症学会学術大会
2011年12月3日 東京
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案
なし

3. その他
なし

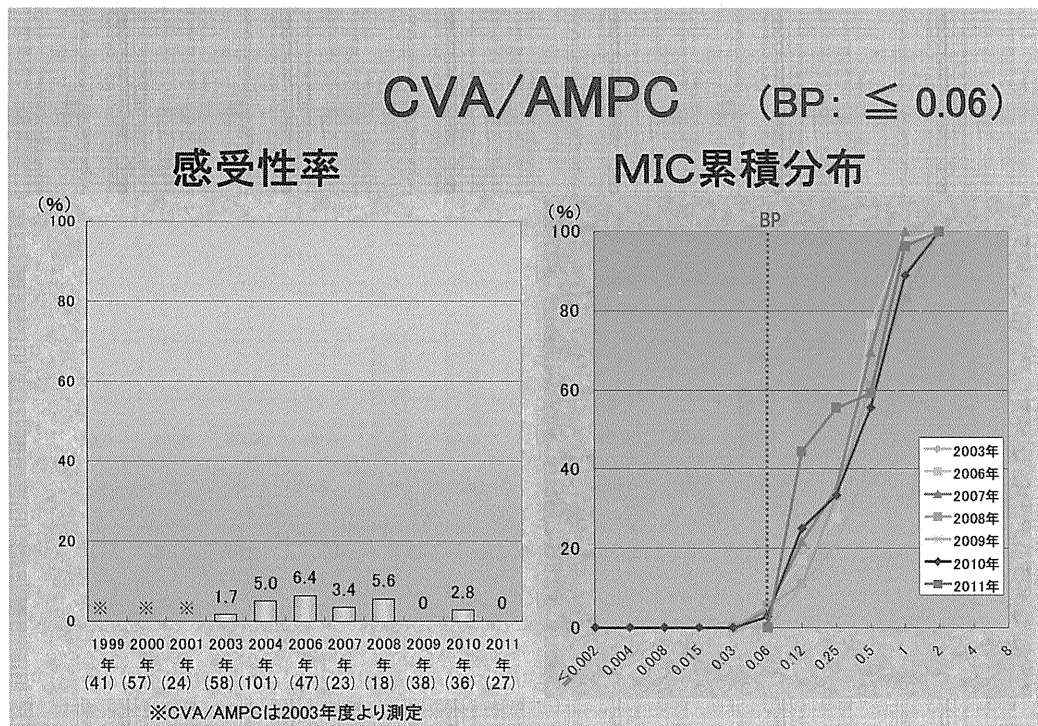
(図1)



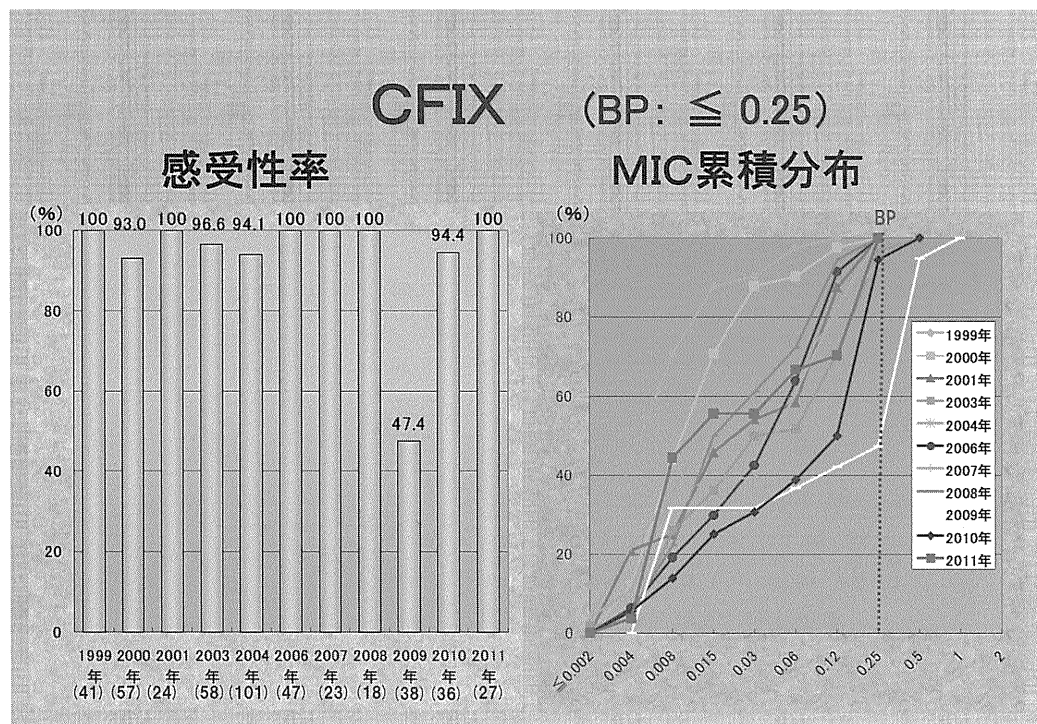
(図2)



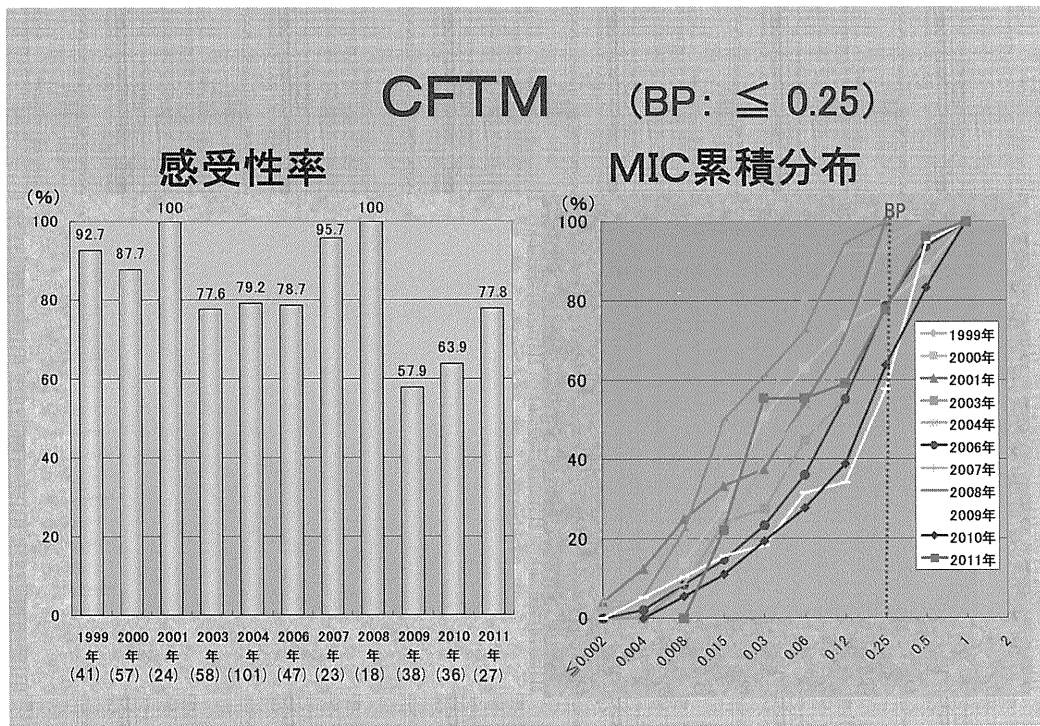
(図3)



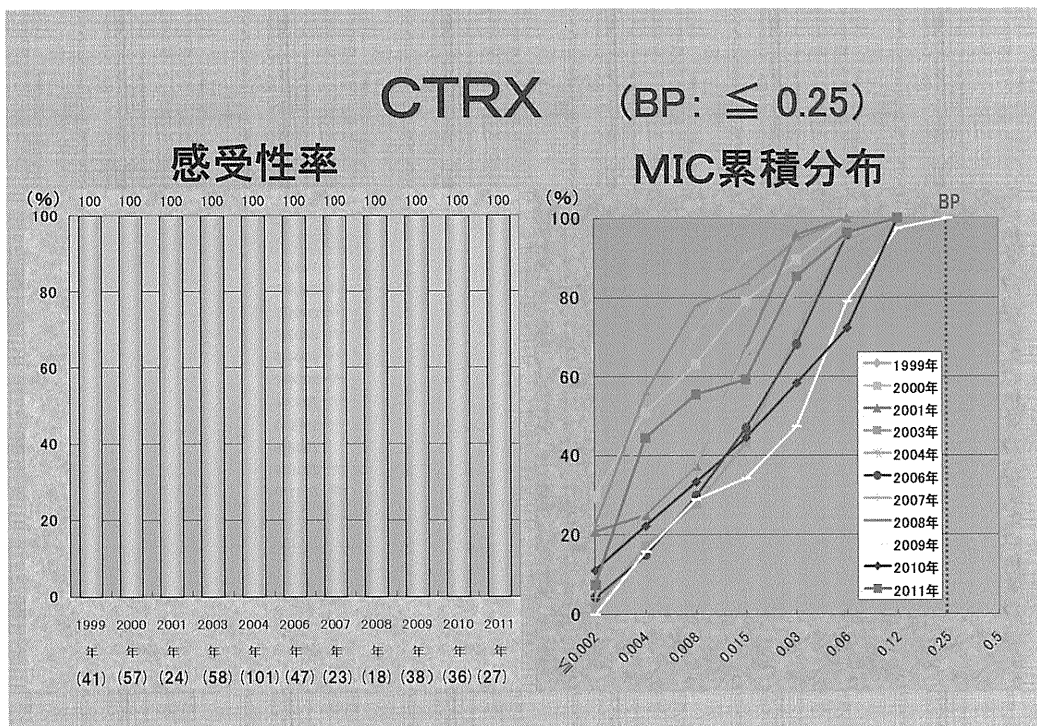
(図4)



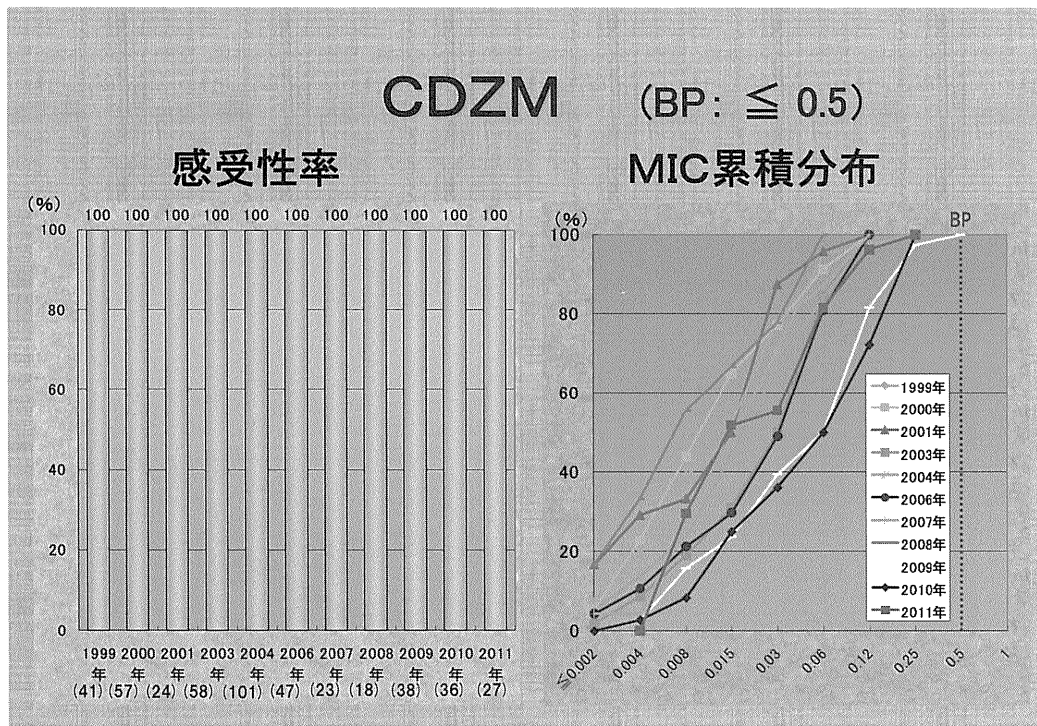
(图 5)



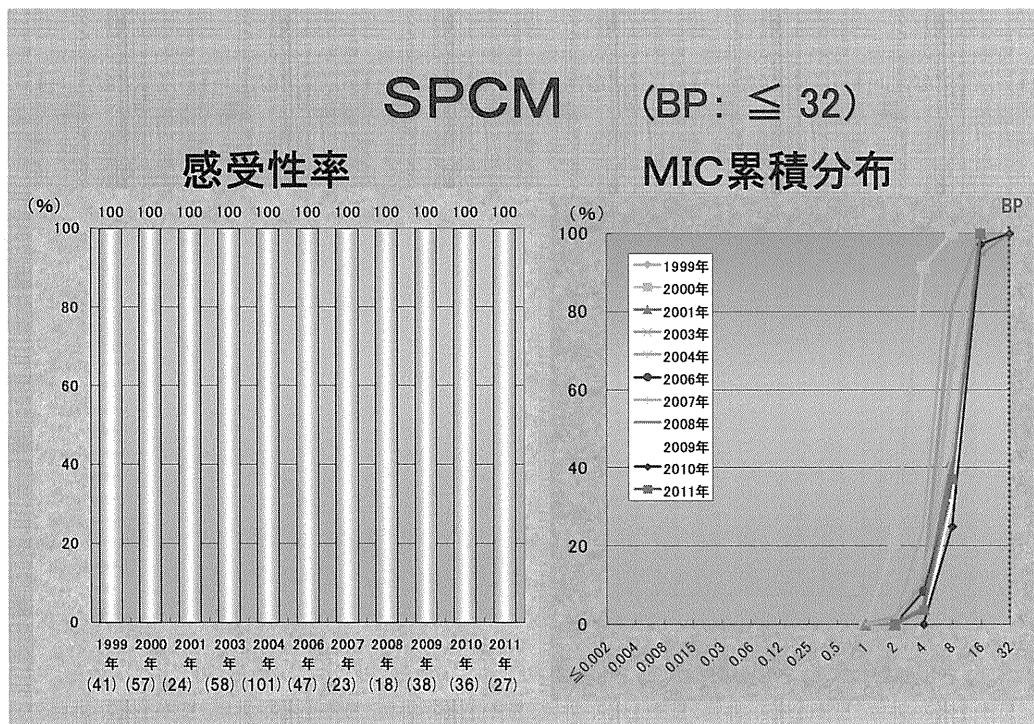
(图 6)



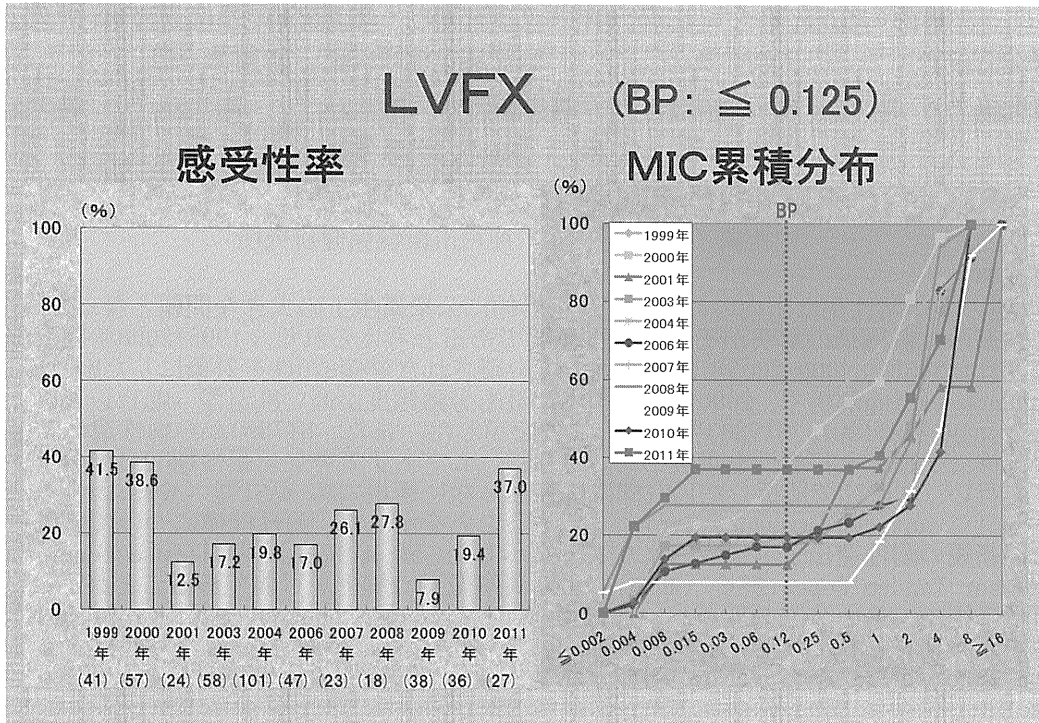
(图7)



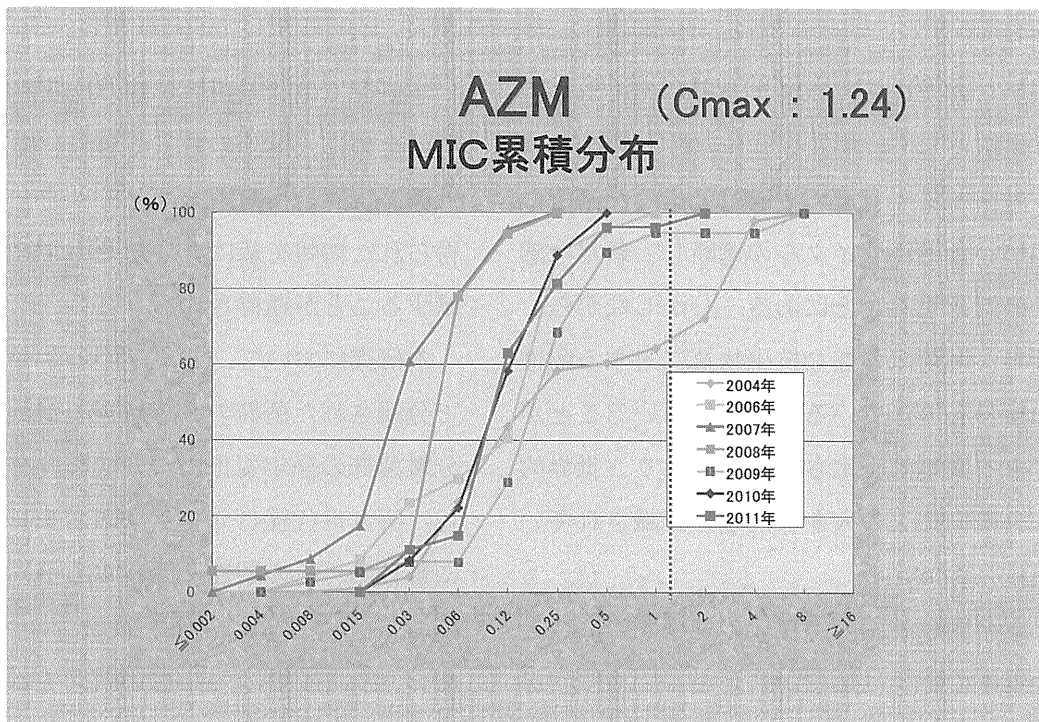
(图8)



(图 9)



(图 10)



「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
中西典子 神戸市環境保健研究所

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。1995-2008年関東地域で分離された345株、2000-2005年に中部地方で分離された淋菌676株を対象にしたMulti-locus sequence typing解析で、2000年以降国内で最も分離頻度が高いMLST型 (Multi-locus sequence typing) ST1901, ST7363型であることを示した。また、ST7363から耐性遺伝子がST1901の菌株に伝播した可能性を示唆した。さらに、セフトリアキソン耐性株H041の分子タイピングを行い、本研究で解析した1021株には存在しない新規のNG-MAST型 (*Neisseria gonorrhoeae* Multi-antigen sequence typing)であることを示した。耐性機構についての解析をおこなない新規の耐性遺伝子が形成されたことを示した。NG-MASTおよびMultiple-locus Variable Number Tandem Repeat解析 (MLVA)により高解像度の解析が可能であることが示した。2000年以降国内で最も分離頻度が高いMLST型 (Multi-locus sequence typing) ST1901, ST7363型を示す菌株に関してさらに新規のタイピング法であるMLVA法を用いて解析することで更に詳細な解析結果をえることが可能となり、さらに国際間の比較が可能となった。

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。

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。

本研究では薬剤耐性淋菌の拡散機構の解明のために、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。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。

本研究において、(1) 関東地域、中部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。(2) 第3世代経口セファロsporin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。(3) 淋菌の分子型

別法を確立のために、NG-MAST, MLVA 法の利用を検討した。

B. 研究方法

菌株

本研究の解析に用いた菌株は神奈川県衛生研究所収集された 1995-2005 年に分離された 197 株、中野総合病院で 2000-2008 年に分離された淋菌 148 株、岐阜大学において分離、収集された淋菌株 676 株を用いた。淋菌を TE 溶液にサスペンドし、熱処理菌液を遠心分離し、上清を PCR の鋳型にもちいた。

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 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 8.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を用いて行った。両株を GC 液体培地中で一晚混合培養し、セフェキシム (0.031 $\mu\text{g}/\text{ml}$) およびシプロフロキサシン (2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 両剤を含む GC 寒天培地を用いて、両剤耐性株を分離した。

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。

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)

MLVA 解析

MLVA (Multiple-locus Variable Number Tandem Repeat Analysis) 法によるフィンガープリンティング法は Heymans らの原法を参考に行った (J. Clin. Microbiol. 2011 49: 354-363.)。

C. 研究結果

MLST 法による解析-解像度

岐阜大学によって 2000-2005 年の間に分離保存された 676 株について MLST 解析を行い、MLST の解像度を検討した (表 1)。見いだされる MLST 型は 100 株当たりで補正すると 7.8 ST であった。多様性指数は 0.73 であった。

Table 1. MLST analysis for *N. gonorrhoeae* (n=676) isolated in 2000-2005.

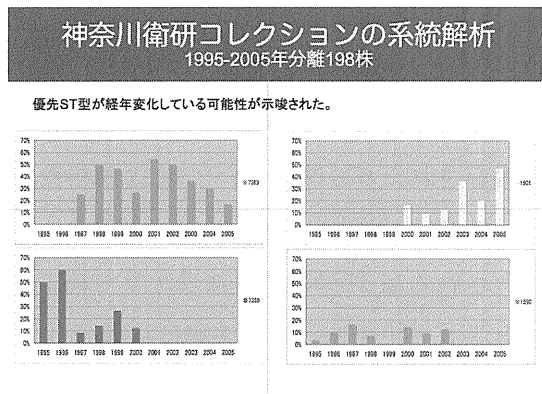
	N. gonorrhoeae isolates (n)	No of STs	Estimated no. of STs/100 isolates	Diversity index
2000-2005	676	53	7.8	0.730
2000-2001	71	12	16.9	0.664
2002	215	26	12.1	0.730
2003	151	22	14.6	0.719
2004	143	24	16.8	0.743
2005	96	14	14.6	0.649

MLST 法による解析-優先 MLST 型と経年変化

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。35 種の ST 型がに分類されたが 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 型が高い分離頻度であった。これら 4 つの ST 型について、分離年ごとの分離率を示した (図 1)。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。一方で、ST7363 は 1997 年に初めて見いだされ、2000 年以降は ST1901 とともに優先株となった。

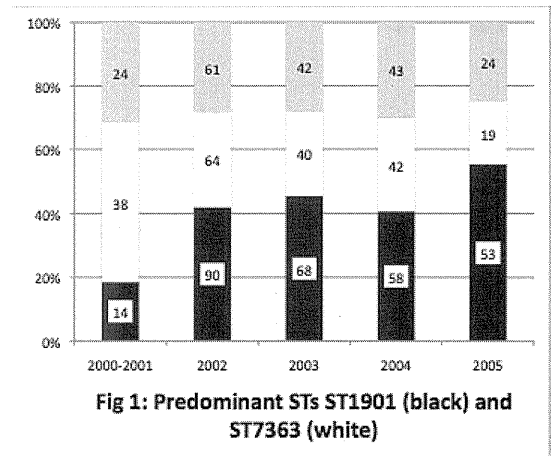
東京で分離された 148 株の解析からも 2000 年以降では、ST1901 (n=42, 28.4%) および ST7363 (n=28, 18.9%) が優先株であった。

図 1



ST7363 および ST1901 が優先株であることは中部地域での分離株 (2000-2005 年) の解析でも同様に示された (図 2)。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。

図 2



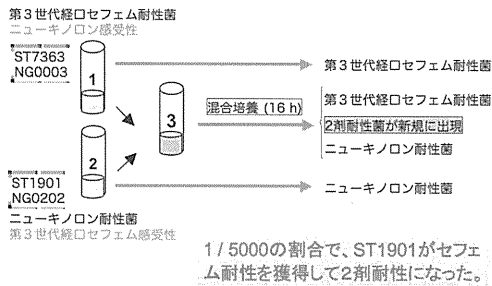
耐性遺伝子の形質転換による伝播

セフェキシム耐性株は *penA* 遺伝子の一部が他のナイセリア属細菌の *penA* 遺伝子を取り込んだモザイク様構造を示す。このモザイク型 *penA* 遺伝子 (*penA-X*) から産生される PBP 2-X においてはセフェキシム結合親和性が低いことが耐性に寄与している。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。

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。このことは、ST7363 から ST1901 に伝播した可能性が示唆された。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。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 (図 3)。

図 3

薬剤耐性淋菌と自然形質転換



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。その結果、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。

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いた可能性を検討するために、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。

セフェキシム感受性 NG0402 (ST1901) 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 (図 4)。

図 4

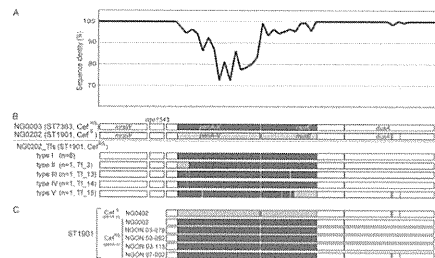


FIG. 4. Sequence diversity in *penA*-*dcaA* regions (6,299 bp) among strain NG0003, strain NG0202, and the transformants generated by *in vivo* cocultivation. (A) Sequence identity of each 100 bp between NG0003 and NG0202. (B) Boxes indicate the five open reading frames in this region, *murE*, *NG0202*, *penA*, *murE*, and *dcaA*. Gray boxes, the highly variable regions; dark gray boxes, sequences that are identical to the sequence of the *penA*-*dcaA* region of NG0003; bright gray boxes, sequences identical to the sequence of the *penA*-*dcaA* region of NG0202; fine vertical lines (white and black), polymorphic sites that match the nucleotide bases of NG0202. (C) Sequence diversity in the *penA*-*murE*-*dcaA* regions of additional clinical isolates of ST1901.

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。つまり、ST7363 から ST1901 への耐性遺伝子伝播は複数回おきたことを示唆した。

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。NG-MAST おいては同一の株は東京、神奈川、岐阜の

1021 株のなかでは見いだされなかった。

前述の通り、セフェキシム系薬剤に対する耐性と *penA* 遺伝子との関連が深いことから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。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。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すこと、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。

NG-MAST 法の解像度に関する検討

MLST 法より解像度が高い方法である NG-MAST の検証をおこなった。解析に用いた岐阜大学コレクション 676 株は、NG-MAT 法により 337 種の NG-MAST 型に分類された。100 株当たりで補正すると 49.9 ST であった。多様性指数は 0.988 と非常に高かった。分離年ごとの多様性指数においても、

0.929-0.982 と非常に高い値を示した (Table 2)。

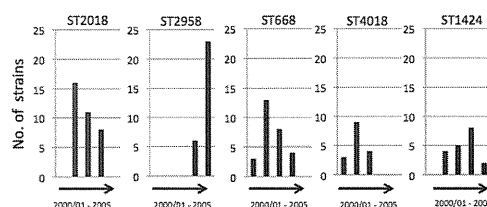
Table 2. NG-MAST analysis for *N. gonorrhoeae* (n=676) isolated in 2000-2005.

	N. gonorrhoeae isolates (n)	No of STs	Estimated no. of STs/100 isolates	Diversity index
2000-2005	676	337	49.9	0.988
2000-2001	71	51	71.8	0.974
2002	215	136	63.3	0.982
2003	151	92	60.9	0.980
2004	143	89	62.2	0.980
2005	96	55	57.3	0.929

15 株以上が同一の型である場合が 5 種類の NG-MAST 型で認められた。これらの分離頻度の高い NG-MAST 型株の分離年毎に解析すると、複数年にわたって分離され、かつ単一のピークを形成していることが示された。特定の地域で伝播したクローンは 3-4 年にわたり広がっていくことが示唆された (図 5)。NG-MAST2018, NG-MAST2958 は MLST1901 に属する菌株で構成され、NG-MAST1424 は MLST7363 で構成される均一性の高い ST 型である。一方、NG-MAST668, NG-MAST4018 はそれぞれ主に MLST1901 あるいは MLST1594 の菌株で構成されているが、他の MLST 型が混在する不均一な構成を示した。

図 5

Fig 3. Temporal change of isolation of major NG-MAST in Central Japan between 2000-2005



MLVA の解像度に関する検討

近年染色体上に存在するタンデムリピートのリピート数が容易に変化することを利用した MLVA (Multiple-locus Variable Number Tandem Repeat Analysis) 法が様々な病原最近で利用されている。オランダの Heymans らにより淋菌にも適用された (J. Clin. Microbiol. 2011 49: 354-363.)。岐阜大学コレクション 676 株に関して、既報に従い解析を行った。その結果、NG-MAT 法により 394 種の MLVA 型に分類された (Table 3)。100 株当たりで補正すると、58.3 の型が見いだされることになる。多様性指数は 0.996 と NG-MAST より高いことが示された。分離年ごとの多様性指数においても、0.9739-0.990 と非常に高い値を示した (Table 3)。また、各年 50~143 種類の型が見いだされた、100 株あたり見いだされる MLVA 型は 66.5-82.3 であり、NG-MAST 法よりも更に解像度が高いと評価された。

Table 3

Table 4. MLVA analysis for <i>N. gonorrhoeae</i> (n=676) isolated in 2000-2005.				
	<i>N. gonorrhoeae</i> isolates (n)	No of STs	Estimated no. of Types/100 isolates	Diversity index
2000-2005	676	394	58.3	0.996
2000-2001	71	50	70.4	0.973
2002	215	143	66.5	0.989
2003	151	121	80.1	0.989
2004	143	116	81.1	0.990
2005	96	79	82.3	0.985

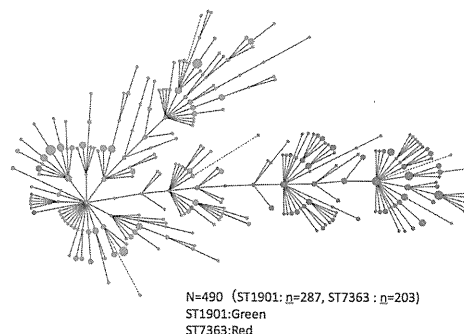
NG-MAST でもっとも大きな株集団である NG-MAST2018 (n=35) は MLVA 解析によりさらに 27 に細分化された。また、2004 年より分離されはじめた NG-MAST2958 (n=29) はさらに 22 の MLVA 型に細分化され、詳細なフ

ィンガープリンティングが可能であることが示された。

MLVA の特性として、比較的系統を反映することが指摘されている。そこで、最も系統的な関係を反映する MLST 解析との比較を試みた。MLST1901 および MLST7363 株の MLVA 解析結果を用いて Minimum spanning tree を描画した (Fig. 5)。それぞれの MLST 型が独立してクラスターを形成し、内部が詳細に分類されることが明らかとなった。しかしながら、MLST1901 と MLST7363 と少数株同士で連結されることも示された。MLVA 法により得たデータで遺伝的関係を検討するためには、より詳細な検討が必要である。

図 6

Fig. 5 Minimum spanning tree of MLST1901 and MLST7363 isolates based on MLVA data set



D. 考察

これまでの本研究結果からは、MLST7363 および ST1901 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が示されている。現在、世界各地で MLST1901 が増加傾向にある。ギリシャにおけるシプロフロキサシン耐性株、オラン

ダにおけるセファロスポリン低感受性株の増加は、MLST1901に属する菌株の増加によるものであることが示されている。国内での伝播状態と、国際的な情報共有を速やかに行うことで、一国、一地域で出現した耐性株の国内、国際間伝播を抑止する方策に繋がる。

本研究において、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。キメラ型 *penA* 遺伝子を獲得したことが強く示唆された。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。

近年、NG-MAST 法による解析が国内外で盛んに行われており、有益な情報が蓄積されてきた。2007-2008 年に分離されたオランダにおけるセファロスポリン低感受性株の増加は、NG-MAST 解析では NG-MAST1407 に属する菌株のクローナルなものであったと報告された (Heymans et al. AAC 2012 56 1516-1522)。本研究においても、NG-MAST の解像度の高さが示されたと同時に、同一の NG-MAST 型が 3-4 年にわたり同一地域で分離されることが示された。

高頻度に分離された NG-MAST 型のうち、

NG-MAST2958 は、Unemo M, et al. によって報告された 2010 年スウェーデンにおけるセフトリアキソン治療失敗例から分離された菌株と同一である (Euro Surveill. 2011;16(6):19792)。中部地方では 2004 年から分離されるようになったことが示されたが、関東地域でも 2006-2009 年に分離されており、Tanaka らの報告 (STD 2011: 38 871-875) では、2008 年福岡で分離された菌株 (n=239) の中で NG-MAST2958 が最も高頻度 (20.5%) であったことが示されている。薬剤耐性淋菌の国際間伝播の可能性が示唆されている中、NG-MAST 法を利用することで、その伝播の形態を捉えることが可能である。詳細な検討を行うためには、NG-MAST とは異なる概念を基盤とした解析法との多角的な解析が必要であると考えられる。Heymans らによって、MLVA 法の適用例が報告された。本研究で解像度の検証を行ったところ NG-MAST と同等、あるいはそれ以上の解像度がえられることを示した。今後 MLVA から得られるデータの評価と遺伝的関連性を見いだす基準の検証が必要である。

フランスにおいて 2010 年に分離されたセフトリアキソン耐性淋菌は、世界で初めて国内で分離された H041 株とは MLST および NG-MAST によって異なる菌株であることが示された。F89 株の耐性機構は、*penA* XXX IV をベースにした、501 位のアラニンがプロリンに置換された 1 アミノ酸置換遺伝子が耐性化をもたらしたことを示されているが、*penA* XXX IV は米国サンフランシスコ

で分離されたセフェキシム低感受性（セフトリアキソン感受性）株（SF-A）で初めて報告された *penA* allele である。SF-A 株は NG-MAST1407 であり、F89 株と同一である。NG-MAST1407 のセフェキシム低感受性株に 1 アミノ酸置換が入ることでセフトリアキソン耐性に変化したと考えられる。NG-MAST1407 株は、中部地方では 2005 年に分離され、Tanaka らの報告（STD 2011: 38 871-875）でも 2008 年福岡分離株で 6.7% を占めている。全国的な調査の必要性が高まってきている。

E. 結論

時間的な淋菌株の変遷と薬剤感受性プロフィールとの関連について本研究で明らかにした。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。

新規セファロsporin耐性株の出現をいち早く探知し詳細な分子タイピングの結果とともに広く周知することが可能であった。

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

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* 17: 148-149, 2011.

4) Nakayama S, Tribuddharat C, Prombhul S., Shimuta S, Srifuengfung S, Unemo M, Ohnishi M. Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 916-920. 2012

5) Ohnishi M., Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, Nakayama S, Kitawaki J, Unemo M. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhoea? Detailed characterization of the first high-level ceftriaxone resistant strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 55: 3538-3545, 2011.