

図 3. 電気泳動を用いたコンタミネーションの判定

電気泳動を用いたコンタミ確認

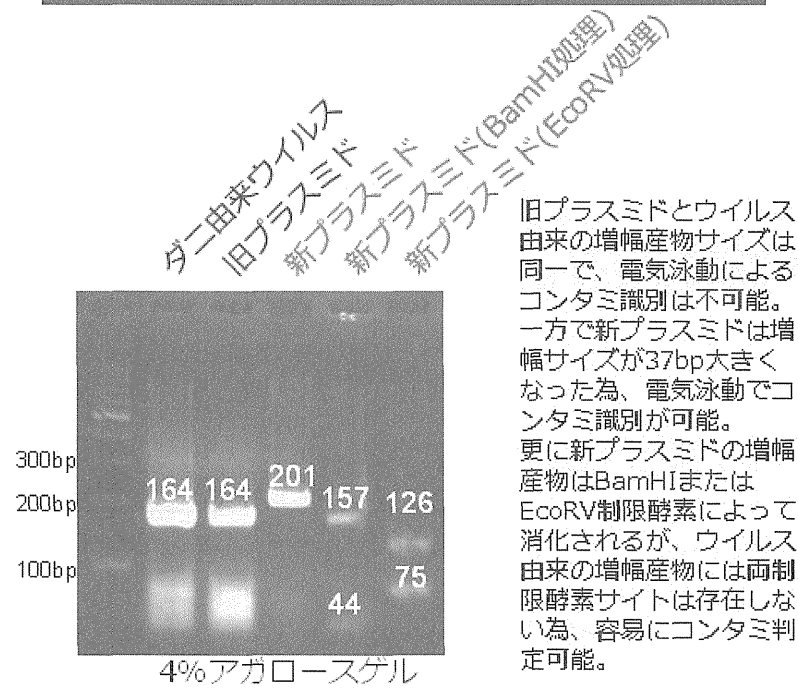
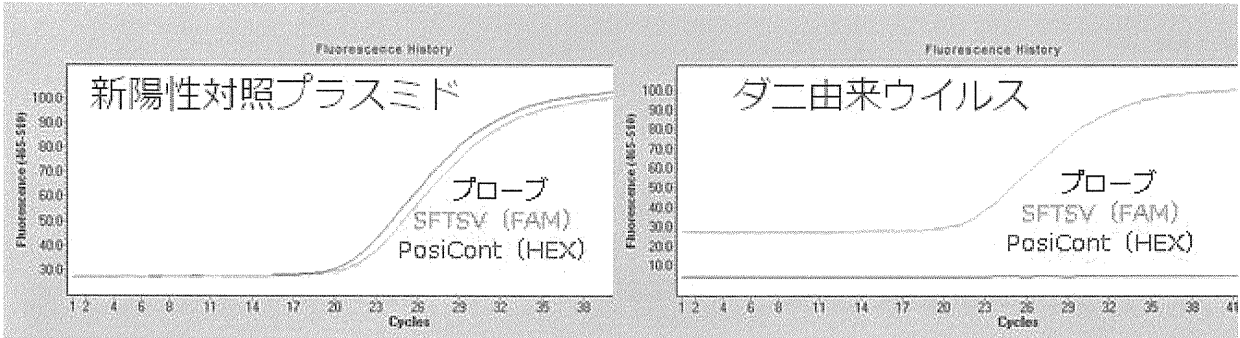


図 4. 2色リアルタイム RT-PCR 法を用いたコンタミネーションの判定

2色法を用いたコンタミ確認 (イメージ図)



新しい陽性対照プラスミドを用いたリアルタイムRT-PCR法では、従来の反応液にPosiCont Taqman probe (catcctgcaccaccaactgcttagcc; 蛍光色素HEXまたはVIC) を添加すれば増幅反応中にプラスミド由来のコンタミをモニタリング可能。

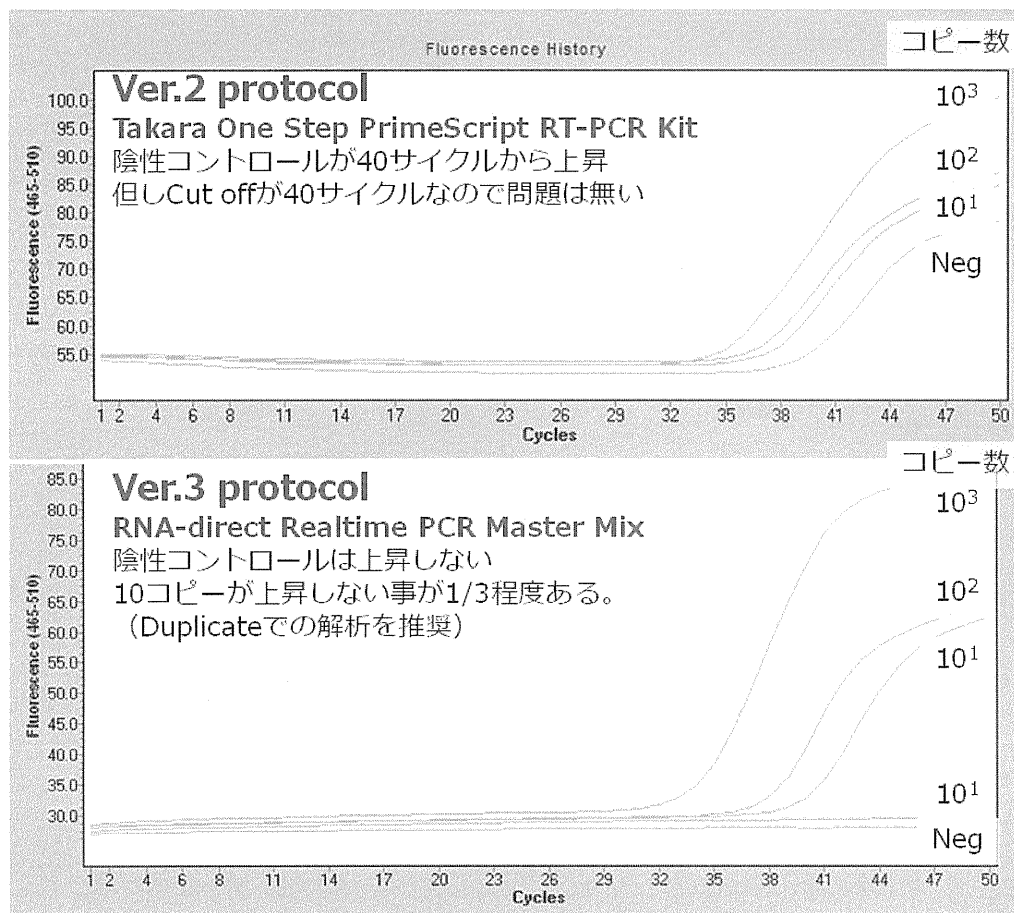
判定方法

- ・ウイルス特異的増幅では緑色のみ増幅が見られる。
- ・一方で新プラスミドがコンタミしていると赤と緑色の両方で増幅が見られる。

図 5. ダニからの SFTS ウイルス検出に用いたリアルタイム RT-PCR 用試薬と温度条件

Takara One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time)			TOYOBO RNA-direct Realtime PCR Master Mix		
RT					
			Denature	90°C	30sec
RT	42°C	5min	RT	61°C	20min
Denature	95°C	10sec	Denature	95°C	30sec
PCR					
50 cycles			50 cycles		
Denature	95°C	5sec	Denature	95°C	5sec
Annealing & elongation	60°C	35sec	Annealing & elongation	64°C	60sec

図 6. リアルタイム RT-PCR 反応試薬の比較



厚生労働科学研究費補助金「アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の強化に関する研究」分担報告書

「Molecular analysis and control of acute respiratory virus infections」

分担研究者 松山州徳 国立感染症研究所 ウイルス第三部四室

研究要旨

急性呼吸器感染症の検査において、原因病原体の特定に至らない検体が多く存在する。近年の検査技術の向上、例えばウイルス高感受性細胞の開発や、マルチプレックス検査法、次世代シーケンサーの導入により、不明とされてきた病原体が明らかになる可能性がある。また本研究班のような国際的な研究者間の情報交換により、検査技術の向上、および新型コロナウイルス発生のような緊急の国際的な感染症発生時において、担当者の円滑な情報交換のできることが期待できる。しかし一方で、最新の技術を駆使してもなお、検出できない病原体があることも事実である。中国側の研究でも今のところ新規病原体の検出には成功していない。本年度我々は、実際に地方衛生研究所より原因不明の上気道炎検体入手し、病原体の分離精製及び同定を行った。その結果検出された病原体は風疹のワクチン株であり、急性呼吸器感染症とは無関係の予防接種に由来するウイルスであることがわかった。本結果は、不明病原体の分離同定の難しさとリスクを示す一例である。

A. 研究目的

急性呼吸器感染症 (ARI) は小児死亡原因の第一位であり、世界では毎日 5,000 人の子供が死亡しているといわれている。多くの ARI ウイルスは咳を介して感染することから感染力が強く、瞬く間に世界中に広がる可能性を内包している。このような感染症に立ち向かうために、我々研究者は国際的なネットワークを構築し、情報を交換できる環境をつくることが必要不可欠であると考え。我々は中国 CDC のインフルエンザ研究センターと連絡をとり、ARI の共同研究体制の構築を試みている。

一方、急性呼吸器感染症の検査の結果、原因を特定できない検体は多数存在する。このような検体入手し、詳細に検査することで、新しい病原体を発見することが、本共同研究の目的である。本課題について中国の研究者と検査体

制と現状について意見交換することの意義は大きい。本年、我々は実際に、地方衛生研究所で診断できなかった患者由来の検体入手し、病原体の特定をおこなうことで、ウイルスの分離同定を行う上での問題点を明らかにした。

B. 研究方法

山形県衛生研究所より提供を受けた不明病原体は、VERO-E6 細胞に感染後 1 週間程度で細胞変性を誘導する。発熱および呼吸器症状の患者の咽頭拭い液より、VERO-E6 細胞を用いて分離され、感染価の計測から、培養上清中に 10^7 PFU/ml 程度の病原体が存在することが分かった。一般的な呼吸器ウイルスの PCR 検査は全て陰性であり、次世代シーケンス (Miseq) の解析では、風疹 23 read、パラインフルエンザ 2 型が 66 read と、わずかに検出され、研

究室内での病原体遺伝子の混入が疑われた。

次に病原体の精製を試みた。500mlの培養上清を用い、常法の PEG 沈殿法にて濃縮後、PBS にて溶解し、シヨ糖密度勾配遠心分離法（15%、40%シヨ糖）にて濃縮精製を行った。濃縮画分の感染価を確認後、電子顕微鏡と次世代シーケンシングを行い、病原体を決定した。

C. 研究結果

電子顕微鏡像では、エンベロップを有する直径 90nm 前後の円形粒子が見られた。さらに次世代シーケンスの結果、風疹ウイルスが、4796 read 検出された。この配列は風疹ワクチン株に3つの変異が含まれるものであった。RK 細胞での細胞変性の形態と、風疹抗体による中和、ウイルス増殖の温度感受性の試験の結果は、いずれもこの病原体が風疹ワクチン株であることを示すものであった。

D. 考察

通常、急性呼吸器症状を示す患者からの検体で、風疹ウイルスの検査を行うことは無いため、ワクチンの患者体内での残存に気付かなかった。患者情報より、本検体の採取から 22 日前に MR ワクチンが接種されていたことが分かっており、一回目の次世代シーケンスデータから、風疹ウイルスを疑うことは可能であったと思われる。病原体検出の際には患者情報の事前の精査が重要である。

一方、病原体不明と判断された検体であっても、そのほとんどが検体採取のタイミングや現行検査法の感度の限界による、既知のウイルスの検査漏れであると考えられ、詳細な病原体解析に進む前段階で、適切に検体をふるい分けるための経験の蓄積とそのプロトコール化が重要であると思われる。

E. 結論

山形県衛生研究所より提供を受けた、VERO-E6 細胞で増殖する不明病原体は、MR ワクチン由来の風疹ワクチン株であると考えられる。本研究では次世代シーケンス、細胞培養、病原体精製、電子顕微鏡などで多くの人員と費用を費やしたが、得られた結果は取るに足らないものであった。しかし行った過程は不明病原体を明らかにするためには必要な作業であり、さらに我々がワクチン株の特定に至ったことは、今回、新規病原体の検出システムを構築できたことを意味する。

F. 研究発表

無し

G. 知的所有権の取得状況

無し

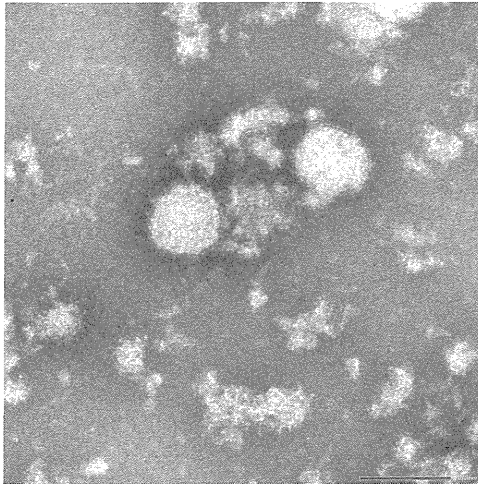


図1 不明病原体の電子顕微鏡写真

VERO-E6 細胞の上清から精製濃縮された病原体は、不鮮明なエンベロップを有する直径 90nm 前後の円形粒子であった。

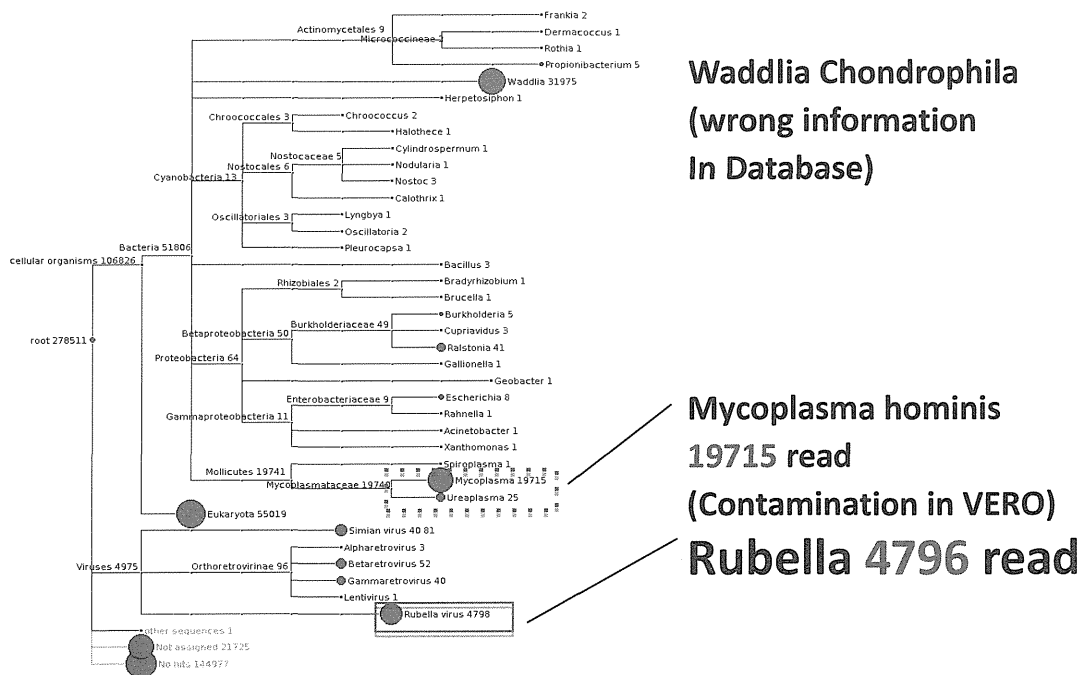


図2 不明病原体の次世代シーケンス

山形県衛生研究所から提供された VERO-E6 細胞でよく増殖する病原体は、発熱、呼吸器症状を示す小児の咽頭拭い液に由来する。この不明病原体を精製し同定したところ、MR ワクチンに由来する風疹のワクチン株であった。

Title

Molecular analysis and control of acute respiratory virus infections

Name

Shutoku Matsuyama

Department of Virology 3, National Institute of Infectious diseases (NIID), Japan

Abstract

An unknown pathogen provided from the Yamagata prefecture institute, which isolated from acute respiratory disease and grow well in VERO-E6 culture cells. We first assessed to identify the pathogen in it using the next generation sequencing (NGS) technique, however no clear evidence of pathogen was seen in the results. Next we purified and concentrated the pathogen by using the precipitation with Polyethylene Glycol and the density gradient centrifugation with sucrose. About 10^8 to 10^8 power of pathogen/ml was concentrated, and a lot of envelope virus like particle was detected in electron microscopy, further the NGS revealed this pathogen was a vaccine strain of rubella virus. Our experience suggests that the working and cost is required for the identification of pathogen.

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と
共同研究体制の強化に関する研究

薬剤耐性淋菌の分子タイピング

研究分担者	中山 周一	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	志牟田 健	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	大西 真	国立感染症研究所	細菌第一部

研究要旨：最後の有効薬剤、セフトリアキソンに耐性の淋菌の出現と拡散動向を把握することを中心に分離株サーベイランスとその分子タイピングを行った。既に出現した *penA* 遺伝子変異による耐性株の顕著な拡散は認められなかった。また、 β -lactamase の基質拡張型変異の一步手前となるタイプの淋菌の存在をタイ、日本で確認していたことを受け、 β -lactamase 保有淋菌分離株の多い中国で、そのような株の存在を検討し、極めて高い存在比率を確認した。前者の拡散を今後とも封じこめるとともに、後者の動向を今後注意深くモニターする必要がある。2007年以降日本でアジスロマイシン耐性株が出現、増加していることを初めて体系的に示した。

A. 研究目的

薬剤耐性の獲得とその拡散が非常に早い淋菌では、継続的な分離株サーベイランスにより、よりタイムリーな治療ガイドライン改定を行う必要がある。従来、国、地域毎に行われてきたこの作業を近隣国と行うことで、より有効なアクションを取れることが期待される。そこで中国との共同での分離株サーベイランスと分子タイピングのプロジェクト開始を目指している。このため、モデルケースとして、近年特に危惧されている、最後の有効薬剤と目されるセフトリアキソンに耐性な淋菌の出現と拡散のモニタリングを兼ねる形で、世界初のセフトリアキソン耐性菌 (*penA* 変異

型) 出現を見た日本の関西地域でのその後の分離株解析と、今後危惧される β -lactamase の基質拡張型変異によるセフトリアキソン耐性菌出現の可能性評価のため、タイの β -lactamase 保有淋菌を解析し、結果を中国の研究者にアナウンスしていた。これを受け、中国の β -lactamase 保有淋菌を解析する。近隣国と共同での最新の分離株サーベイランス結果の結果の国間比較により、耐性プロファイル、菌系統の類似点、相違点を継続的に把握することで、国間のクローナル拡散の傾向について基礎的データが得られる。このことは、将来、新規な耐性がどちらかの国で発生した場合の他方への到来の時期を予測する根拠と

なるため、両国での治療ガイドラインのよりタイムリーな改定法の確立に向け有用である。このための基礎データ収集を中国との間で確立するための交渉でモデルデータとして使う実例を作製する。

また、2009年に日本でも使用認可されたアジスロマイシンに対する耐性株出現が危惧されることから、これに絞ったサーベイランスを東京地区の株、前年度 NG-MAST 型分布調査に使用した株集団を対象にして精査する。

B. 方法

1) 分離株：

日本国内株は、今年度については、Retrospective な解析を企図して、2005~2011年に首都圏で分離した147株を使用し、分子タイピングを行い、改めてアジスロマイシン耐性株をスクリーニングした。

中国側株の β -lactamase 保有淋菌1株、不明淋菌株1株を用いて、変異型 β -lactamase 遺伝子検出 PCR のプロトコルチェックを兼ね、現地でこの2株を検討していた。これを受けての南京での PPNG 解析には2007年分離株199株と2012年分離株77株を使用した旨了解した。

1) MIC 測定：

E test シート (AB bioMerieux, Solna, Sweden) を用いて、仕様書に従って測定した。

2) NG-MAST タイピング：

確立している Martin らの方法¹⁾に従った。

3) 変異型 β -lactamase 遺伝子、TEM-135 検

出 PCR

我々が開発した方法⁴⁾に従った。

C. 研究結果

1) 首都圏2005年~2011年分離株のサーベイランス、NG-MAST タイピング：

前年度、世界流行型であり、多剤耐性と強い相関が見られる ST1407 の日本での初検出から主流型となるまでの過程の一端を明らかにできたところであった。

2009年に日本においても使用が可能となったアジスロマイシンに対する耐性淋菌株のサーベイをこの株集団を対象にして行った。その結果、2007年より程度耐性株が検出され始め、2011年には4株に増加、またそれらが前述の ST1407 型として有為な clonarity を示す集団として存在したことを明らかにした⁸⁾。各年の耐性株数は2005~2006年がゼロ、2007年が2、2008~2009年がゼロ、2010年が2、2011年が4で、2011年には MIC=16 を示し、23S rRNA に点変異を持つ株2株が含まれる。アジスロマイシン使用は耐性を生じ易く、注意が必要なことは分かっていたが、経口薬である有利点から、使用認可された。今回のデータは耐性株出現と拡散、MIC 上昇の過程を初発からタイムコースを追ってレトロスペクティブに追えており、実際に示した点で有意義であった。

2) 中国に於ける β -lactamase 保有淋菌 (以下、PPNG と呼ぶ) の解析：

PPNG の保有する β -lactamase は近年まで、プロトタイプの TEM-1 以外は発見されてい

かったが、2009年タイと日本で、初めて TEM-135型を保有するものが検出された^{2,3)}。TEM-135は基質拡張型β-lactamaseではないが、1塩基置換変異のみで基質拡張型の TEM-20 となり得るタイプである。対して、TEM-1は知られているいかなる基質拡張型になるにも最低2塩基の変異を必要とする。そこで、TEMタイプの決定をも含めて、2005年～2008年に分離されたタイの96株のPPNGの分子タイピングを行っていた。結果、以下のことが分かった。

96株中、TEM-135は9株(9.4%)、他の87株はすべて(90.6%) TEM-1であった。この2つのタイプ以外は発見されなかった。1塩基置換のみで基質拡張型となり得るものがマイナー、～10%の比率ながら、タイでサーキュレーションしていることが初めて示されていた⁴⁾。

これを受け、PPNGの分離率が全淋菌株30%をも占める中国でのTEM-135のサーベイランスが重要と考えカウンターパートの南京CDC施設で中国株解析を前年度に共同で行っていた。

実際にはカウンターパート側に意向で、今回はプロトコルチェックを主眼として、淋菌株2株、うち1株がPPNGを解析したが、その1株はTEM-135型のPPNGであった。

これ以降の南京CDC施設での中国国内のPPNG解析により、2007年及び2012年のPPNGに占めるTEM-135の比率がいずれも58%にも上ることが判明した⁹⁾。

D. 考察

国内でのサーベイランス結果から、多剤耐

性という性状と強く相関し、世界的に流行している ST1407 は、日本では2006年に初検出され、その後2009年まで ST2958 に次ぐ分離率で推移し、2010年から最頻型となっていたプロファイルを明らかにできた。その多剤耐性という性状からも今後の監視が重要である。さらには2007年以降、アジスロマイシン耐性株が検知され、2011年にはこの ST1407 型の耐性株が複数検出された。今後この型の拡散が危惧され、監視体制強化が望まれる。セフトリアキソン耐性に関連して、今後、出現に備えるターゲットは、基質拡張型β-lactamaseを保有するPPNGである。前述のように、これに関しては基質拡張型の前駆体、中間体とも言うべき TEM-135 の存在が確認され、そのタイに於ける prevalence も約10%、という具体的な数字を我々は算出していた⁴⁾。予備検討で中国のPPNG株1株を解析し、それが TEM-135 であったことから、中国での TEM-135 存在率はタイ以上であることも考えられた。また、中国ではPPNGの全分離淋菌に占める割合自体が～30%にも及ぶため、TEM-135の総数は非常に多いと懸念されたが、実際に今回の2007年と2011年の解析結果で、いずれの年もPPNG中58%ものTEM-135が検知されたことにより、基質拡張型β-lactamaseによるセフトリアキソン耐性出現が近い将来に起こりえると危惧されるデータを得た。中国に於ける、TEM-135のサーベイランス、prevalenceの調査とその上昇の監視に加え、それからの基質拡張型、TEM-20の新生を注意深くモニターしていく必要があると思われる。

E. 結論

日本及びフランスで確認された変異型 *penA* 遺伝子によるセフトリアキソン耐性は現在、顕著な拡散状況にないが、今後その動向を引き続き観察する必要がある。日本国内で、セフトリアキソン MIC が上昇傾向にある NG-MAST ST1407 型菌が増加している。日本でのその発生から最頻型となっていた過程を推定することができた。また、この型の一部の株はアジスロマイシン耐性を獲得していることが判明した。今後この動向を注視すべきである。基質拡張型 β -lactamase によるセフトリアキソン耐性菌出現が危惧されている。基質拡張型の前駆体タイプの PPNG がタイでマイナー集団ながら存在確認されたことから、中国での PPNG についても検討し、中国でもこれが現存すること、タイでの存在率よりさらに高く過半数であるという危惧すべき状況が確認された。このタイプの prevalence 上昇と基質拡張型の新成をモニターしていく必要がある。このプロジェクトは元来、中国との共同研究であるが、中国側の正式合意が未決であるため、現在共同研究の形では進行できていない。今後、PPNG の多い中国でのそれらの株の解析の重要性をさらに説明し、たとえば自発的な形であってもプロジェクトを本格始動させる必要がある。

謝辞

今回解析した国内菌株を分与くださった、(株) 医学生理学研究所の高山美奈子先生に感謝いたします。

F. 参考文献

- 1) Martin, I. M. C., Ison, C. A., Aanensen, D. M., Fenton, K.A., and Spratt, B. G. 2004. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J. Infect. Dis.* **189**:1497-15015.
- 2) Srifuengfung, S., et al. 2009. Prevalence of *Chlamidia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in HIV-seropositive and gonococcal antimicrobial susceptibility: an update in Thailand. *Jpn. J. Infect. Dis.* **62**:467-470.
- 3) Ohnishi, M., Ono, E., Shimuta, K., Watanabe, H., Okamura, N. 2010. Identification of TEM-135 β -lactamase in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains in Japan. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **54**:3021-3023.
- 4) Nakayama, S., Tribuddharat, C., Prombhul, S., Shimuta, K., Srifuengfung, S., Unemo, M., and Ohnishi, M. 2012. Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **56**:916-920.
- 5) Tanaka, M, et al. 2011. Anti-biotic-resistant phenotypes and genotypes of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Japan: Identification of strain clusters with multidrug-resistant phenotypes. *Sex. Trans. Dis.* **38**:871-875.
- 6) 志傘田健、飛田収一、伊東三喜雄、藤原光文、上田朋宏、亀岡博、古林敬一、川畑拓也、大西真。2012。「京都府と大阪

府における 2010 年-2011 年に分離された淋菌株の性状解析」日本性感染症学会誌. **23**:83-89.

- 7) Shimuta, K., Unemo, M., Nakayama, S., Morita-Ishihara, T., Dorin, M., Kawahata, T., and Ohnishi, M. 2013. Antimicrobial resistance and molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Kyoto and Osaka, Japan, 2010 to 2012: Intensified surveillance after identification of the first strain (H041) with high-level ceftriaxone resistance, *Antimicrobiol. Agents Chemother.* **57**:5225-5232.
- 8) Takayama, Y., Nakayama, S., Shimuta, K., Ishihara-Morita, T., and Ohnishi, M. 2014. Characterization of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Tokyo in 2005-2011. *J. Infect. Chemother.* Accepted.
- 9) Chen, S. C., Yin, Y. P., Dai, X. Q., Yu, R. X., Han, Y., Sun, H. H., Ohnishi, M., Unemo, M., and Chen, X. S. 2013. Prevalence and molecular epidemiological typing of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* and their *bla*(TEM-135) gene variants in Nanjing, China. *Sex Transm. Dis.* **40**:872-876. (Ohnishi, M. は協力研究者)

G. 研究発表

1. 学会発表

1) 井戸田 一朗、中山周一、石原 朋子、志牟田 健、大西 真:「梅毒トレポネーマの DNA 検出法と蛍光抗体法の検討」日本性感染症学会第 25 回学術大会、岐阜、2012 年 12 月

2. 論文発表

- 1) Nakayama, S., Tribuddharat, C., Prombhul, S., Shimuta, K., Srifuengfung, S., Unemo, M., and Ohnishi, M. 2012. Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**:916-920.
- 2) Shimuta, K., Unemo, M., Nakayama, S., Morita-Ishihara, T., Dorin, M., Kawahata, T., and Ohnishi, M. 2013. Antimicrobial resistance and molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Kyoto and Osaka, Japan, 2010 to 2012: Intensified surveillance after identification of the first strain (H041) with high-level ceftriaxone resistance, *Antimicrobiol. Agents Chemother.* **57**:5225-5232.
- 3) Takayama, Y., Nakayama, S., Shimuta, K., Ishihara-Morita, T., and Ohnishi, M. 2014. Characterization of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Tokyo in 2005-2011. *J. Infect. Chemother.* Accepted.
- 4) Chen, S. C., Yin, Y. P., Dai, X. Q., Yu, R. X., Han, Y., Sun, H. H., Ohnishi, M., Unemo, M., and Chen, X. S. 2013. Prevalence and molecular epidemiological typing of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* and their *bla*(TEM-135) gene variants in Nanjing, China. *Sex Transm. Dis.* **40**:872-876. (Ohnishi, M. は協力研究者)

Molecular typing of drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*

Shu-ichi Nakayama (Department of Bacteriology I, NIID, Japan)

Yue-ping Yin (National Center for STD Control, CCDC, China)

Abstract:

We performed surveillance of *Neisseria gonorrhoeae* isolates and several molecular typings to monitor any emergence/expansion of those resistant to Ceftriaxone, which is supposed to be the last-line effective drug. Concerning to *penA* mutated type of the resistant isolate, we have not detect the second resistant isolate after the 1st emergence of that in 2009 in Japan.

In the retrospective surveillance of the isolates in Tokyo metropolitan area 2005 to 2011, we found that NG-MAST ST1407 and ST2958 are major types in the area. This result meets other surveillance data. However, in addition to this, it turned out that the very first emergence of these types occurred in 2006. Only with the retrospective analyses, we could reach this important information. Furthermore, we have detected, among this group, azithromycin resistant strains with significant clonality of ST1407. The emergence of the resistance have been worried after the approve of the use of the drug in Japan in 2009. And, in fact, we have confirmed the first detection in 2007 and significant expansion of the resistance in 2011.

Because Ceftriaxone is a kind of β -lactam, *Neisseria gonorrhoeae* harboring extended-spectrum β -lactamase gene on its plasmid would be Ceftriaxone-resistant. Especially, TEM-135 type β -lactamase is worrying, because it is thought to be a direct precursor to an extended-spectrum β -lactamase, TEM20. So, we performed a trial screening of TEM135 in China, where *Neisseria gonorrhoeae* with β -lactamase (PPNG) is about 30% of the total *Neisseria gonorrhoeae*. In this trial, we tested 2 isolates obtained in China. And 1 of those was with TEM-135 type β -lactamase. This result indicated that, in China, TEM-135 a direct precursor to an extended-spectrum β -lactamase, is surely circulated, and the share of them among PPNGs are as high as 58%. This calls an alert that, in the future, they might become an mutated β -lactamase type Ceftriaxone resistant *Neisseria gonorrhoeae*. So, we found that *Neisseria gonorrhoeae* with β -lactamase must be carefully monitored including TEM typing systematically in especially China.

A. Object

In the control of Gonococcus infections, timely

revision of the treatment guidelines is essential because of rapid gain of drug resistance by *Neisseria gonorrhoeae* and rapid expansion of the resistance. This requires the continuous surveillance of the bacterial isolates. Conventionally, this action has been conducted in each country and area. However, it is apparent that if we can this project in collaboration with neighbor countries, more appropriate and quicker revision of the guidelines can be expected. So, we seek to start the collaboration with China, in which we survey the clinical isolates and molecular typing of them in the both countries synergistically. In the first trial of this action, as a model project, we decided that it is better to concentrate in the monitoring the resistant isolates to Ceftriaxone. Ceftriaxone is thought to be the last remained option in treatment of *Neisseria gonorrhoeae* infection and emergence and expansion of the resistant isolates is worrying. We, in Japan, detected the first Ceftriaxone-resistant isolate with mutated *penA*. Since after, we performed strengthened surveillance of the isolates in Kansai area of Japan, where the first resistant isolate was detected. We also analyzed Penicillinase-Producing *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG) isolates in Thailand in order to estimate the probability of emergence of Ceftriaxone-resistant isolates with Extended spectrum type mutated version of Penicillinase (β -lactamase). We announced the results of those analyses to the counterpart in China. Based on these data, we wanted to analyze PPNG isolates in

China. The collaborated surveillance of isolates with neighbor countries, thorough the comparing the resistance profiles along with molecular types, etc. between countries and continuous sharing of the information, would help understanding how the clonal expansion of isolates beyond the borders occur. This is quite informative when we must predict how rapid the newly emergent resistant isolate in one country would invade the other. This effect finally is of use for the more properly and more rapid revision of the guidelines in the both countries. In order to compile the basic data approaching to this ultimate goal, we started surveillance in Japan and, partly, PPNG analysis in China.

B. Methods

1) Bacterial isolates:

Japan:

In this fiscal year, those isolated within Tokyo metropolitan area, year 2005 to 2011. In total, 147 isolates were served for the analysis. This time, we sought retrospective analysis of seeking any azithromycin-resistant strain, whose emergence has been worried since the approve of the drug in Japan in 2009.

China:

One PPNG isolate, and one unknown to be PPNG or non-PPNG, were employed. These two were served for screening PCR of a mutated penicillinase gene, TEM-135. Only these two were analyzed because, this time, the counterpart side mainly wanted to check the detailed protocol of the screening PCR.

Background information of these isolates was not given to us, including isolation year.

After that, the Nanjin institute performed the investigation of TEM-135 with utilization of 199 strains in 2007 and 77 strains in 2012, we have been informed.

2) Measurements of MIC:

E-test sheets (AB bioMerieux, Solna, Sweden) were used following manufacturer's recommendations.

3) NG-MAST Typing:

We followed the methods reported by Martin et al.¹⁾

4) Screening PCR detecting a mutated version of β -lactamase gene, TEM-135:

We followed the methods reported by our group⁴⁾.

C. Results

1) Surveillance of Japanese isolates:

Azithromycin-resistant in Tokyo metropolitan area year 2005 to 2011:

Among the total isolates (147), those with either of the two NG-MAST Types have gotten the majority: ST2958(19/147), and ST1407(16/147). Number of isolates with other ST types was less than 5 for each type. We believe this is very important information, because ST1407 is evaluated as a world wide-successful type and is strongly linked with the characteristic of multi-drug resistance. And there has not been any report implying the first emergence of that type. Among these isolates, we have detected Azithromycin-resistant isolates since the year of 2007. And the significant expansion in 2011 with

a clonality of NG-MAST ST1407 was evident.

The two of the isolates in 2011 also showed the high MIC of 16 and had 23S rRNA mutations responsible for the high level resistance⁸⁾.

2) Analysis of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG) isolates in China:

Until recent years, other type of β -lactamase gene than the prototype TEM-1 has not been reported in PPNG. In the year 2009, in Thailand and Japan, PPNGs with TEM-135 β -lactamase were first reported^{2,3)}. Although TEM-135 itself is not an extended-spectrum type of β -lactamase (ESBL), it can become an ESBL, TEM-20, by only single nucleotide exchange. On the other hand, the prototype TEM-1 requires at least two nucleotide exchanges to become any known ESBL. Thus, TEM-135, unlike TEM-1, is evaluated as a 'direct precursor to an ESBL'. Accordingly, we analyzed PPNG isolates in Thailand including TEM typing since year 2005 to 2008. In Japan, isolation of PPNG is very rare and we found systematic analysis of PPNG there is not fruitful. In total, 96 PPNG isolates were served for this analysis. Out of them, 9 isolates (9.4%) were with TEM-135. The other 87 isolates (90.6%) were all with TEM-1. No other TEM type was detected. Thus, TEM-135, a direct precursor to an ESBL, is surely circulated in Thailand, although as a minor group of around 10% rate⁴⁾.

Based on this result, we have been convinced that it is very important to analyze PPNG systematically in China, where isolation of PPNG

is as frequent as about 30% of total isolation number. Thus, we collaborated to analyze PPNG in China at the institute of counterpart in Nanjin. This time, however, they wanted mainly to check detailed protocol of TEM-135 screening PCR, And, only two isolates, including one unknown to be PPNG or non-PPNG, were analyzed. Among these two, one was non-PPNG, and the other was PPNG with TEM-135 β -lactamase.

After that, the Nanjin institute performed the investigation of many PPNGs in China, and discovered that TEM-135 rates in the total PPNG is as high as 58%, in 2007 and 2012⁹⁾.

D. Discussion

In this fiscal year, in our domestic surveillance of clinical isolates, we found that some historical profile of NG-MAST ST1407. Namely, the type, strongly linked with the characteristic of multi-drug resistance and worldwide successfulness, was first emergent in year 2006 in Japan and kept the second prevalence rate next to ST2958 up to year 2008. And, since year 2010, it has been the most prevalent type. Because of its characteristic of multi-drug resistance and worldwide successfulness, we must still carefully monitor this ST type isolates. Moreover, it turned out that since 2007, azithromycin-resistant isolates has started to be detected, and in the year 2011, they are circulated as a clonal group of ST1407 with elevated MIC of around 16. Concerning to Ceftriaxone resistance, we have not detected second resistant isolates after the first emergence of that with mutated-*penA* type in

2009 in Japan. This might suggest that this type of resistant isolate has not gained secondary mutation compensating the growth cost of the mutated *penA*. However, we must premise, sooner or later, they would gain such secondary mutation and would expand properly as proved through the past time experiences. In this context, we have to totally keep careful surveillance targeting this kind of isolates.

In addition to this, since now on, we also have to prepare the newly emergence of other type. Namely, PPNG isolates with mutated, extended-spectrum β -lactamase (ESBL). As stated above, existence of TEM-135, a 'direct precursor' to an ESBL, in PPNG has been confirmed. And, the prevalence rate among the total PPNG has also estimated specifically as around 10% in our report⁴⁾.

This time, in China, one PPNG isolate was analyzed and it turned out to be with TEM-135. From the static point of view, we expect that the prevalence of TEM-135 in China is larger than in Thailand. Moreover, in China, isolation rate of PPNG among total *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates are as high as 30%. So, we have worrying that total number of *Neisseria gonorrhoeae* is much higher in China than in Thailand. We must actively conduct TEM-135 surveillance including prevalence rate, and increasing of it, along with monitoring new generation of TEM-20, an ESBL, from TEM-135. Thus, we have actually investigated this issue and found that, in China, as high as 58% of total PPNG have TEM-135 *bla*⁹⁾.

E. Conclusion

We have not detected significant expansion of mutated-*penA* type Ceftriaxone resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates after first emergence of that in Japan. However, it is required to keep monitoring it carefully.

In Japan, NG-MAST type ST1407, which is strongly linked to multi-drug resistance, world-wide successfully expansion, and also to somewhat decreased susceptibility to Ceftriaxone, is first emergent in year 2006, and has become the most prevalent type since year 2010. We have to keep monitoring this type carefully. Moreover, it turned out that since 2007, azithromycin-resistant isolates has started to be detected, and in the year 2011, they are circulated as a clonal group of ST1407 with elevated MIC of around 16⁸⁾.

A newly generation of another type of Ceftriaxone resistant *Neisseria gonorrhoeae*, with mutated, extended-spectrum β -lactamase (ESBL) is worrying. We have confirmed the existence of isolates with a direct precursor to an ESBL in Thailand, although as a minor group. In this year, we also investigated the existence also in China, and found that it surely exist in China, and that, from the static point of view, prevalent rate as well as total number of it might be higher in China than in Thailand. As stated above, this was truly the case, and further beyond our worrying; The TEM-135 rate in PPNG in China was as high as 58%. We must monitor increasing of the rate of this type PPNG along with possible new generation of an ESBL, especially TEM-20 from

TEM-135 in China.

This project is originally collaboration with Chinese counterpart. However, at present, China CDC has not officially agreed these projects' conduction in National Center for STD Control in Nanjing. Importance of this surveillance of PPNG in China, where PPNG is frequent, must be repeatedly explained to China side. We hope that even in some unofficial manner, if not thoroughly, we could conduct this kind of surveillance in China.

Acknowledgement

We thank Dr. Minako Takayama, who provided us clinical isolates in Tokyo metropolitan area.

F. References

- 1) Martin, I. M. C., Ison, C. A., Aanensen, D. M., Fenton, K.A., and Spratt, B. G. 2004. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J. Infect. Dis.* **189**:1497-15015.
- 2) Srifuengfung, S., et al. 2009. Prevalence of *Chlamidia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in HIV-seropositive and gonococcal antimicrobial susceptibility:an update in Thailand. *Jpn. J. Infect. Dis.* **62**:467-470.
- 3) Ohnishi, M., Ono, E., Shimuta, K., Watanabe, H., Okamura, N. 2010. Identification of TEM-135 β -lactamase in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains in Japan. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **54**:3021-3023.

- 4) Nakayama, S., Tribuddharat, C., Prombhul, S., Shimuta, K., Srifuengfung, S., Unemo, M., and Ohnishi, M. 2012. Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **56**:916-920.
- 5) Tanaka, M, et al. 2011. Anti-biotic-resistant phenotypes and genotypes of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Japan: Identification of strain clusters with multidrug-resisstant phenotypes. *Sex. Trans. Dis.* **38**:871-875.
- 6) Shimuta, K., Hida, S., Itoh, M., Fujiwara, M., Ueda, T., Kameoka, H., Furubayashi, K., Kawahata, T., and Ohnishi, M. 2012. Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Kyoto and Osaka, 2010-2011, *Japanese Journal of Sexually Transmitted Infections* **23**:83-89. (Manuscript in Japanese, English abstract available.)
- 7) Shimuta, K., Unemo, M., Nakayama, S., Morita-Ishihara, T., Dorin, M., Kawahata, T., and Ohnishi, M. 2013. Antimicrobiol resistance and molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Kyoto and Osaka, Japan, 2010 to2012: Intensified surveillance after identification of the first strain (H041) with high-level ceftriaxone resistance, *Antimicrobiol. Agents Chemoter.* **57**:5225-5232.
- 8) Takayama, Y., Nakayama, S., Shimuta, K., Ishihara-Morita, T., and Ohnishi, M. 2014. Characterization of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Tokyo in 2005-2011. *J. Infect. Chemoter.* Accepted.
- 9) Chen, S. C., Yin, Y. P., Dai, X. Q., Yu, R. X., Han, Y., Sun, H. H., Ohnishi, M., Unemo, M., and Chen, X. S. 2013. Prevalence and molecular epidemiological typing of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* and their *bla*(TEM-135) gene variants in Nanjing, China. *Sex Transm. Dis.* **40**:872-876. (Ohnishi, M. is a collaborator)

G. Presentation

1. Oral presentation in society meetings

1) Itoda, I., Nakayama, S., Ishihara, T., Shimuta, K., and Ohnishi, M. 2012. Evaluation of detection of *Treponema pallidum* DNA by PCR and the bacterial body by fluorescence-conjugate antibody. The 25th annual meeting of Japanese Society for Sexually Transmitted Infections. City of Gifu, Dec. 2012.

(Presentation in Japanese, English abstract not available.)

2. Published articles

1) Nakayama, S., Tribuddharat, C., Prombhul, S., Shimuta, K., Srifuengfung, S., Unemo, M., and Ohnishi, M. 2012. Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **56**:916-920.

2) Shimuta, K., Unemo, M., Nakayama, S.,

- Morita-Ishihara, T., Dorin, M., Kawahata, T., and Ohnishi, M. 2013. Antimicrobial resistance and molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Kyoto and Osaka, Japan, 2010 to 2012: Intensified surveillance after identification of the first strain (H041) with high-level ceftriaxone resistance, *Antimicrobiol. Agents Chemother.* **57**:5225-5232.
- 3) Takayama, Y., Nakayama, S., Shimuta, K., Ishihara-Morita, T., and Ohnishi, M. 2014. Characterization of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Tokyo in 2005-2011. *J. Infect. Chemother.* Accepted.
- 4) Chen, S. C., Yin, Y. P., Dai, X. Q., Yu, R. X., Han, Y., Sun, H. H., Ohnishi, M., Unemo, M., and Chen, X. S. 2013. Prevalence and molecular epidemiological typing of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* and their *bla*(TEM-135) gene variants in Nanjing, China. *Sex Transm. Dis.* **40**:872-876. (Ohnishi, M. is a collaborator)