

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）

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、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 のプロトコールチェックを兼ね、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-resisstant phenotypes. *Sex. Trans. Dis.* **38**:871-875.
- 6) 志牟田健、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. 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 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 Chemoter. **56**:916-920.
- 2) 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 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)