

- 集会 2013.9.20～22 岐阜大学
- 3) Nguyen Dung、下田宙、濱崎千菜美、寺田農、野口慧多、鍛田流星、高野愛、森川茂、前田健 飼育犬から重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスと交差する抗体の検出 第156回日本獣医学会学術集会 2013.9.20～22 岐阜大学
 - 4) 谷口怜、福士秀悦、Joseph Masangkay、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂 フィリピンのコウモリからの SFTS ウイルスと交差する抗体の検出 第156回日本獣医学会学術集会 2013.9.20～22 岐阜大学
 - 5) 宇田晶彦、福士秀悦、加来義浩、吉河智城、下島昌幸、新倉綾、安藤秀二、川端寛樹、高野愛、前田健、藤田博己、澤邊京子、西條政幸、森川茂 マダニからの SFTS ウイルス遺伝子の検出 第156回日本獣医学会学術集会 2013.9.20～22 岐阜大学
 - 6) 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、宇田晶彦、谷口怜、福間藍子、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の確定診断に使用されているコンベンショナル PCR の評価、及びリアルタイム定量PCR との比較 第61回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 7) 福間藍子、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、谷口怜、下島昌幸、森川茂、前田健、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の血清学的診断法の開発 第61回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 8) 西條政幸、高橋徹、前田健、水谷哲也、大松勉、吉河智城、谷英樹、福士秀悦、下島昌幸、福間藍子、緒方もも子、鈴木忠樹、中島典子、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、山岸拓也、倉根一郎、森川茂 後方視的に重症熱性血小板減少症候群と診断された11名のウイルス学的・臨床的・疫学的研究 第61回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 9) 森川茂、木村昌伸、福士秀悦、福間藍子、加来義浩、朴ウンシル、谷英樹、吉河智城、井上智、今岡浩一、下島昌幸、西條政幸、前田健 SFTS ウイルス抗体陽性動物の調査 第61回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 10) 谷口怜、福士秀悦、Joseph Masangkay、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、福間藍子、吉河智城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂 フィリピンのコウモリからの重症熱性血小板減少症候群ウイルスに反応する抗体の検出 第61回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 11) 宇田晶彦、福士秀悦、加来義浩、吉河智城、下島昌幸、新倉綾、井上智、安藤秀二、前田健、西條政幸、森川茂 マダニからの SFTS ウイルス遺伝子の検出 第61回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 12) 谷英樹、下島昌幸、福間藍子、谷口怜、吉河智城、福士秀悦、森川茂、西條政

幸 重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP を外套したシュードタイプ VSV の作製 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場

- 13) 高橋徹、亀井敏昭、前田健、水谷哲也、下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、森川茂、長谷川秀樹、中島典子、鈴木忠樹、永田典代、片野晴隆、山岸拓也、大石和徳、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の日本における初症例 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
- 14) 前田健、濱崎千菜美、久保翔太郎、遠藤泰之、寺田農、鋤田流星、高野愛、下田宙、森川茂 国内飼育犬から重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスに対する抗体の検出 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1. 組換えバキュロウイルスによる SFTSV-NP の発現・精製とウサギ免疫血清の作製

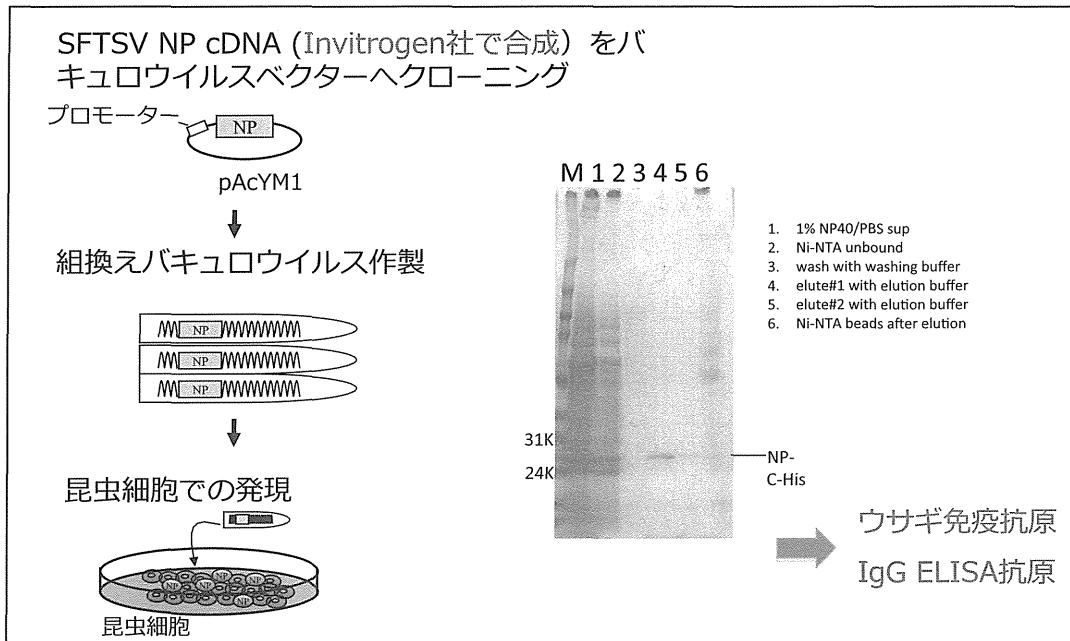


図2-1. 組換え抗原による ELISA

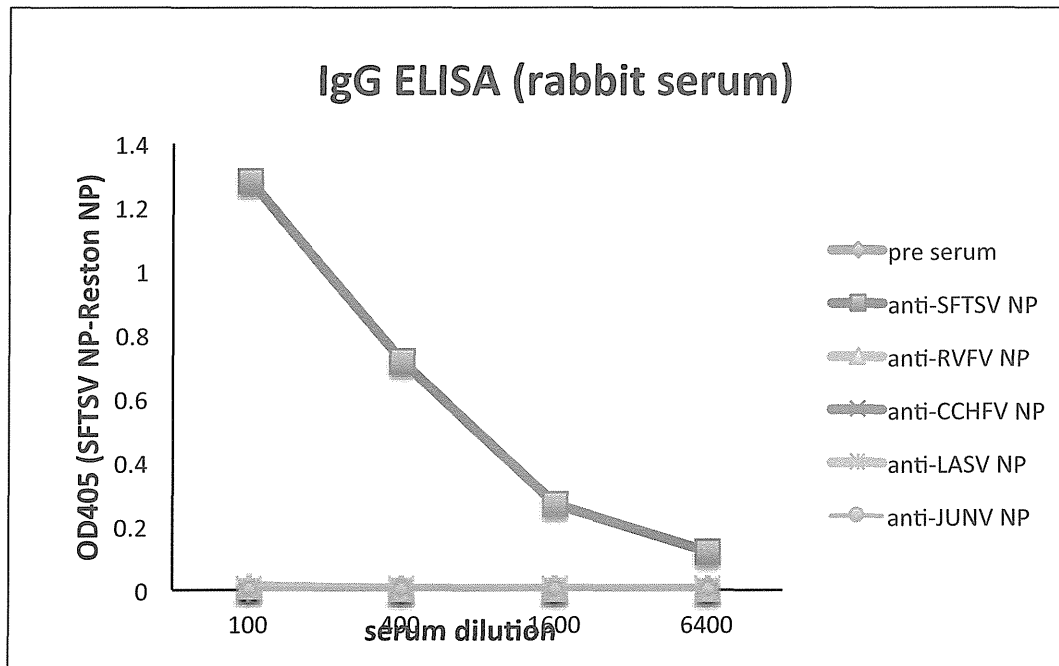


図2-2. SFTS ウイルス感染細胞由来抗原による ELISA

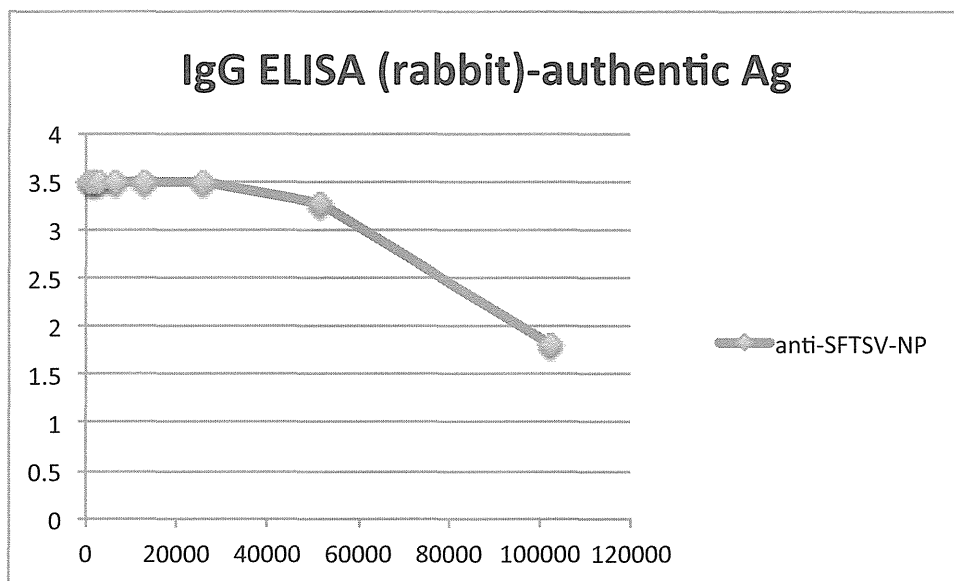


図2-1の組換え抗原による ELISA と比較して30倍以上感度が高い。

図3. SFTSV-NP 発現 HeLa 細胞を抗原とする間接蛍光抗体法

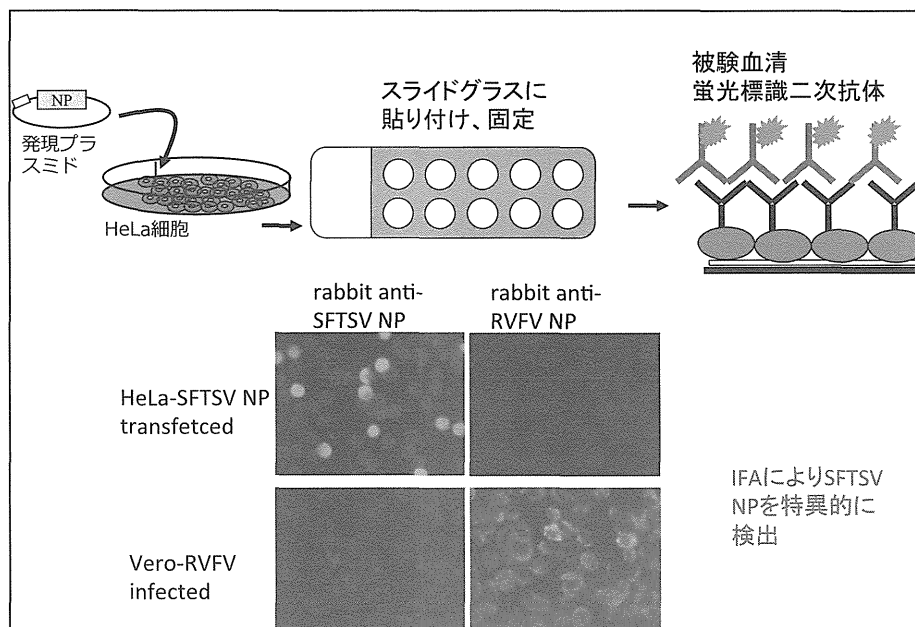


図4. 陽性コントロールプラスミド構築の概要

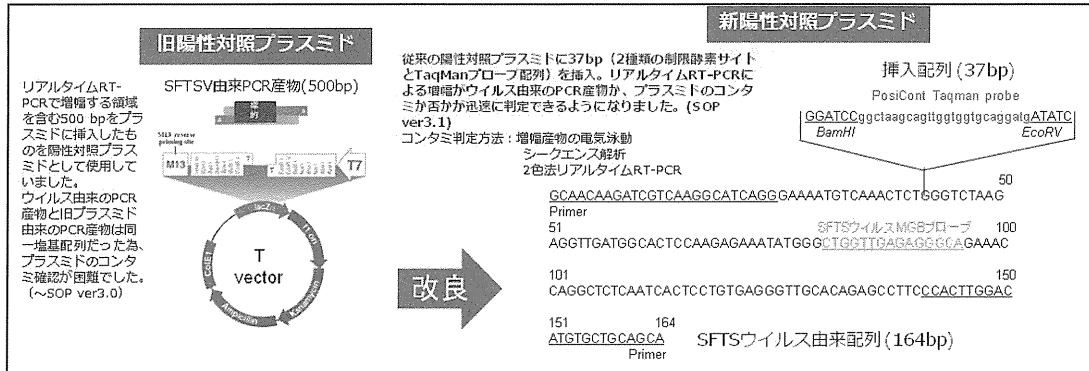


図5. 電気泳動を用いたコンタミネーションの判定

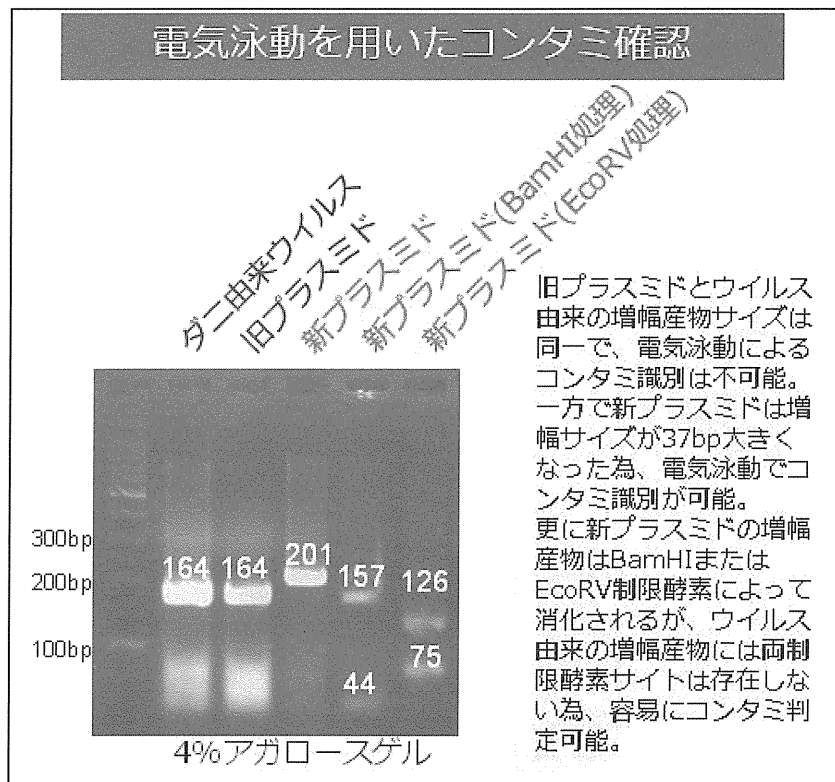


図6. 2色リアルタイム RT-PCR 法を用いたコンタミネーションの判定

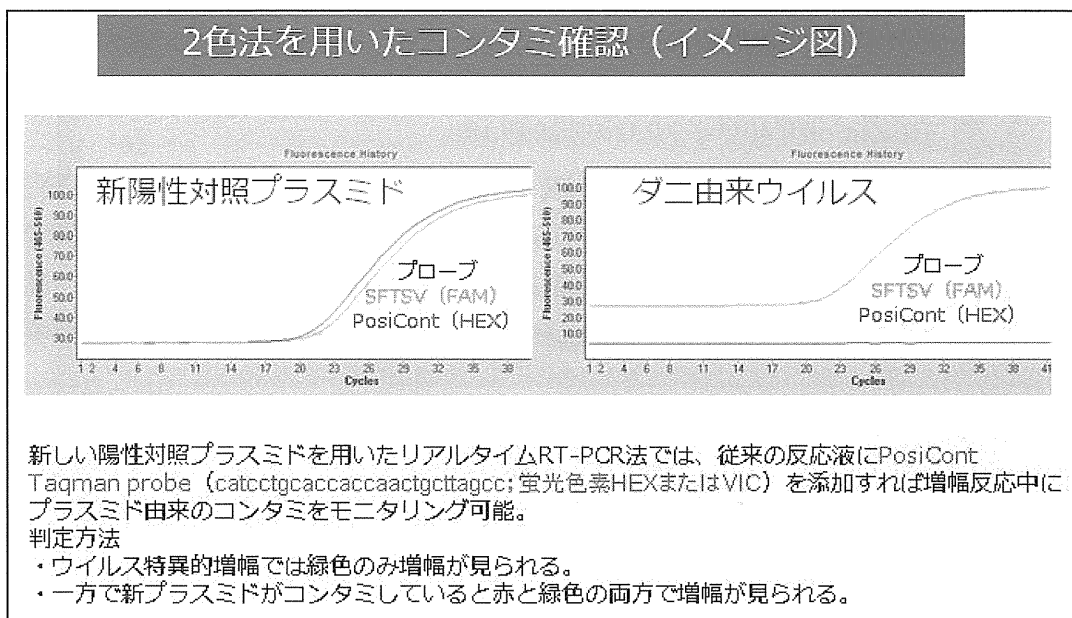
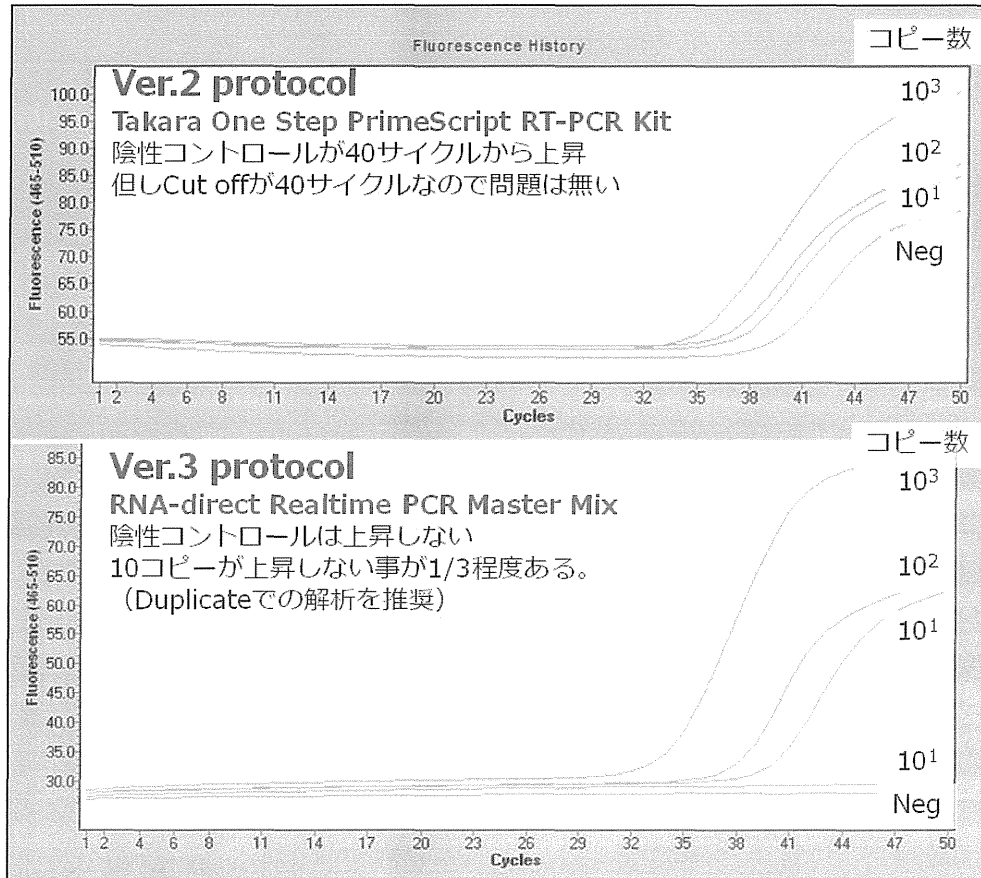


図7. ダニからの SFTS ウイルス検出に用いたリアルタイム RT-PCR 用試薬と温度条件

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8. 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(ARI)ウイルスの多くは、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、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ます。ARI ウイルスにはインフルエンザ、RS、パラインフルエンザ、メタニューモ、コロナ、アデノ、ライノ、ボカウイルスが知られており、95%はこれらを原因とするが、残り5%の原因は未だに不明である。今回、中国 CDC の Yuelong Shu 博士と情報を共有し、インフルエンザ以外の ARI ウイルスについて、原因不明病原体の解析、ウイルス分離技術の向上を試みた。まず、ARI の検査に利用するための、ウイルス高感受性細胞の作成を試みた。数種の ARI ウイルス(インフルエンザ、メタニューモ、コロナ)は肺に特異的に発現している膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 を利用して細胞に感染することが報告されており、TMPRSS2 の発現した細胞を作成し、既存のヒトコロナウイルス(229E、NL63、SARS)と新型コロナウイルス(MERS-HCoV)に対する感受性を比較した。TCID50、ウイルス増殖、感染細胞の免疫染色を行ったが、いずれのウイルスでも TMPRSS2 発現細胞の方が非発現細胞よりも感受性が高かった。特に新型コロナウイルスでは 100 倍もの高い感受性が見られた。またウイルス増殖が非常に低いと考えられている NL63 において、51 倍の増殖が見られた。TMPRSS2 細胞はコロナウイルスの研究とサーベイランスの分野に貢献できるものと考えられる。一方、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。しかし、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を入手し、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

ARI ウイルスの研究を難しくしている原因は様々あるが、その一つは、肺胞の性質を維持している良い培養細胞株が無いことにある。培養細胞で増殖が可能なウイルスは研究が良く進み、

不可能なウイルスは研究が遅れる傾向がある。ヒト肺胞上皮細胞の初代培養は難しく、数代の継代で肺胞の性質が無くなってしまふことが知られている。最新の初代培養法を用いれば、肺胞の性質とインフルエンザウイルスの感受性を維

持したまま長時間培養できることが報告されているが、特殊な技術であり、簡単に扱えるものではない。また、よく研究に利用されている肺胞由来の細胞株は、肺胞の性質をある程度維持しており、低いながら様々な ARI ウイルスに感受性があるが、増殖が遅く性状が不安定であり、培養も難しい。肺胞の性質を維持しつつ扱いやすい培養細胞があれば、新たな ARI ウイルスの分離や既存の ARI ウイルスの基礎研究が劇的に進展することが期待できるだけでなく、病原体診断やサーベイランスの分野でも利用できるはずである。最近の我々の研究から、コロナウイルスは、肺胞特異的プロテアーゼ (TMPRSS2) を利用して感染することがわかっている。この知見を他の ARI ウイルスにも広げて、呼吸器ウイルスに対する高感受性細胞を樹立したい。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。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問題点を明確にした。

B. 研究方法

・ 呼吸器ウイルス高感受性細胞作成の試み
VERO 細胞に TMPRSS2 を発現させた細胞 (Shirogane Y J Virol. 2008) を譲り受け、感染実験に用いた。また HeLa 細胞でも同様に TMPRSS2 発現細胞を作成した。様々なヒトコロナウイルス (229E, NL63, OC43, SARS, EMC) を感染させ、細胞変性効果、TCID50、ウイルス増殖を比較した。また、細胞変性を示さなかった NL63 については、抗スパイク蛋白抗体を用いて免疫染色をおこない、感染価を比較した。

・ 不明病原体の解析

山形県衛生研究所より提供を受けた不明病原体について、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。続いて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

・ 高感受性細胞について

HCoV-EMC は TMPRSS2 非発現細胞では感染 48 時間で細胞のラウンディングが起こるのに対し、発現細胞では 16 時間程度で、著しく大きい細胞融合が見られた。同じ感染価のウイルスを用いて TCID50 で比較した場合、TMPRSS2 発現細胞ではウイルス感受性が 100 倍程度高くなっていた (表)。SARS-CoV については、既に 2010 年に報告している結果と同様であるが、TMPRSS2 発現細胞で、TCID50 は 7.9 倍、ウイルス増殖は 2.5 倍であった (表)。鼻風邪、上気道炎のコロナウイルス NL63 については、細胞変性効果は見られなかったが、免疫染色による感染細胞の計測結果 (FFU) では TMPRSS2 発現細胞では 51 倍感受性が高くなっていた (表)。また他の鼻風邪、上気道炎コロナウイルス 229E には 1966 年に分離され、長年研究室で継代されているラボ株と、2008 年に分離された臨床株があるが、ラボ株で 1.4 倍、臨床株で 11.5 倍の HeLa/TMPRSS2 での感受性が見られた (表)。さらに、鼻風邪上気道炎コロナウイルスの OC43 は HeLa では全く細胞変性効果が見られなかったが HeLa/TMPRSS2 では細胞の浮遊が見られた。感受性細胞として知られる RD 細胞との比較では、HeLa/TMPRSS2 の方が 10 倍程度ウイルス感受性が高くなっていた (表)。

・不明病原体について

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

・ 呼吸器ウイルス高感受性細胞について

コロナウイルスのスパイク蛋白の活性化にはプロテアーゼが必要と考えられており、本研究で用いた細胞では TMPRSS2 がスパイクを活性化したと考えられる。呼吸器ウイルスの多くがウイルスは肺胞特異的なプロテアーゼ、特に TMPRSS2 を利用して感染すると考えられるので、コロナウイルスと同様に、ARI ウイルスを分離するためには、TMPRSS2 発現細胞を使うことが望ましいと思われる。

・ 不明病原体の解析について

実際のウイルス分離作業に際して、まずは患者情報の詳細な検討の末に、可能性のある病原体を詳細に解析した後に、次世代シーケンス解析を行うべきである。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

1. HeLa 及び Vero の TMPRSS2 発現細胞はコロナウイルスの分離に有効な細胞である。

2. 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

カウンターパートの研究計画

中国インフルエンザサーベイランスネットワーク
(441インフルエンザ実験室、556定点病院)

10~15臨床検体(インフルエンザ様疾患)/年/定点病院

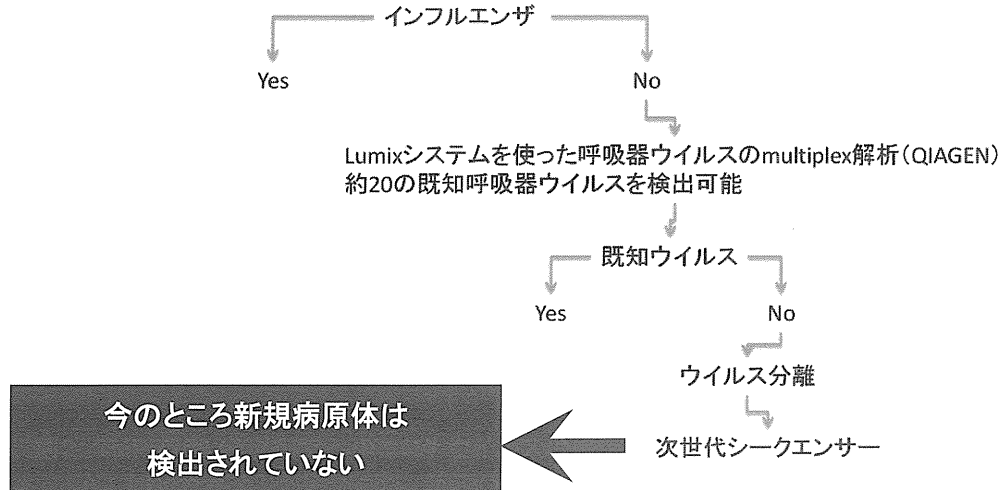


図1 中国 CDC インフルエンザセンター(Dr. Yuelong Shu)との共同研究
インフルエンザサーベイランスネットワークで得られる検体の中から、道の病原体を検出する試み。

表. TMPRSS2 発現細胞のコロナウイルス感受性

Virus	Assay	VERO	VERO/TMPRSS2	倍率
EMC	TCID50	4.3±0.5	6.3±0.5	100
	growth@24h	3.8±0.4	4.3±0.7	3.2
SARS	TCID50	6.3±0.5	7.2±0.9	7.9
	growth@48h	5.7±0.3	6.1±0.2	2.5
NL63	FFU	2.1	3.8	51
	growth	Not done	Not done	-

Virus	Assay	HeLa	HeLa/TMPRSS2	倍率	
229E	ラボ株	growth@48h	5.0	5.1	1.4
	臨床株	growth@48h	3.7	5.0	11.5
OC43	TCID50	NoCPE	4.5	RD細胞の10倍	
	growth	Not done	Not done	-	

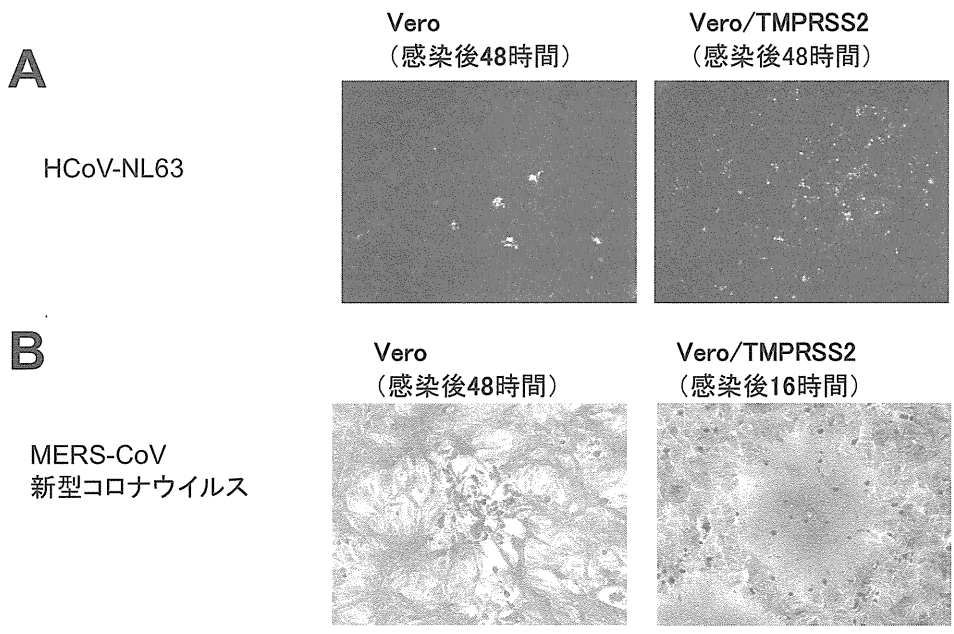


図2. TMPRSS2 発現細胞へのコロナウイルスの感染
 A. HCoV-NL63 感染細胞は、抗スパイク蛋白抗体で検出した
 B. 新型コロナウイルスの感染細胞の光学顕微鏡写真

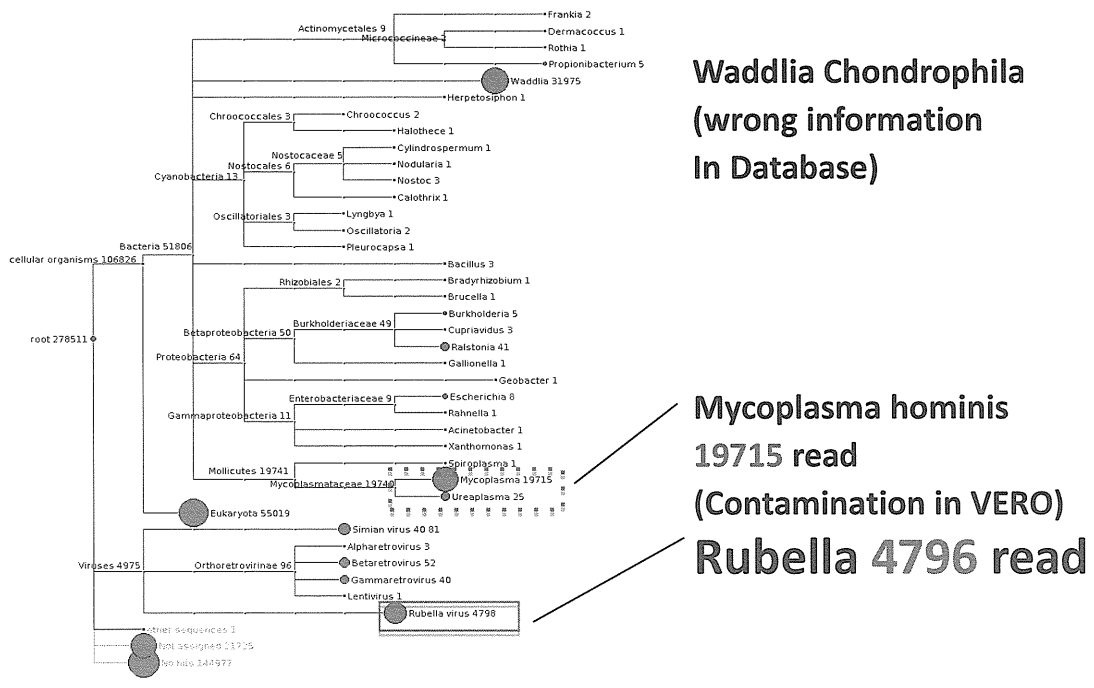


図3 不明病原体の次世代シーケンス
 山形県衛生研究所から提供された VERO-E6 細胞でよく増殖する病原体は、発熱、呼吸器症状を示す小児の咽頭拭い液に由来する。この不明病原体を精製し同定したところ、MR ワクチンに由来する風疹のワクチン株であった。

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。

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った。

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株を検討した。株の分離年等の情報は知らされなかった。

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：

全体として ST2958(19株)と ST1407(16株)とで主流を占めていた。他の ST は5株以下であっ

た。

日本での体系的な NG-MAST 解析は、2008年の福岡での検討⁵⁾、2010~2012年の京都・大阪での検討^{6)、7)}、

があり、この2タイプで主流を占める傾向は今回と一致している。しかし、今回は2005年からの retrospective 解析を行ったことで、既報のようなスナップショットデータでは得られない知見も得た、即ち、①この現在主流の2タイプ ST2958、1407 はいずれも2006年に初例が検出され、いずれも2008年に prevalence のピークを示し、その後漸減しながらも10%以上の分離率を維持していること。②2008年、2009年では ST2958 が有為に ST1407 より多いのに対して、2010年、2011年ではそれが逆転していること。③この2009年と2010年での相変異が日本国内で有ったと考えると2008年の福岡での検討⁵⁾では ST2958 の方が多く、2010~2011年の京都・大阪での検討⁶⁾では ST1407 の方が多かったことを説明できること。

以上より世界流行型であり、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。

また、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⁾。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を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なかったが、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共同で行った。実際には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関連し、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。この型の一部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. 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 a 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 with these isolates, and conducted NG-MAST typing. These group has been used for the surveillance target of the screening of the azithromycin-resistant NG also, 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