

## A. 研究目的

マイコプラズマ・ジェニタリウム (*M. genitalium*) は非淋菌性尿道炎および子宮頸管炎の病原微生物である。*M. genitalium* の病原性に関しては、数多くの疫学的、臨床的研究がわが国および世界中から行われており、統計学的にも有意差をもってその病原性は証明されている。近年、この *M. genitalium* の抗菌薬に対する耐性化が問題となってきた。わが国では *M. genitalium* の検査、および治療は保険適用となっていない。このため、非淋菌性尿道炎の治療は、最も頻度高く分離されるクラミジア・トラコマティスに対する治療が行われ、マクロライド系、テトラサイクリン系、キノロン系抗菌薬が使用される。しかし、これら3薬剤に対して耐性を示す *M. genitalium* 株が世界的に蔓延している。これらの抗菌薬による治療失敗例が世界中から報告されているほか、数株の耐性株が分離されている。*M. genitalium* 性尿道炎に対しては、レスピラトリー・キノロンに分類される抗菌薬の有効性が示されており、海外ではモキシフロキサシン、わが国ではシタフロキサシンが有効である。したがって、近い将来、クラミジアと *M. genitalium* 感染症を検査により診断し、別々の抗菌薬により治療を行う必要がでてくると考えられる。このため、わが国においても *M. genitalium* の検査法を確立し、保険適用を目指す必要がある。

韓国の Seegene 社は *M. genitalium*、淋菌、クラミジアのほか *Trichomonas vaginalis*、*Ureaplasma urealyticum*、*Ureaplasma parvum*、*Mycoplasma hominis* の7種類の微生物を同時に検出する検査システム (Anyplex system) を開発した。本システムはすでに韓国、ドイ

ツでは発売されており、治療に有効であることが方法されている。我々は本システムの *M. genitalium* 検出法に注目し、今システムの *M. genitalium* 株に対する基礎的検討より、数種類の *M. genitalium* 株の検出、また、本システムで想定される *M. genitalium* 検出の最低保証限界を検討することとした。

## B. 研究方法

**研究1**：臨床検体(尿道炎患者の尿)を用いて、MgPa PCR法16S PCR法による *M. genitalium* の検出を比較した。また、MgPa PCR法によりDNAコピー数を算出し、DNAコピー数と検出率との関連を検討した。

**研究2**：我々が保有する *M. genitalium* 17株を用いて、Anyplex systemの基礎的検討を行った。これらの菌株より3方法(Chelex法、QIAGEN法、GeneAll法)にてDNAを抽出し、Anyplex systemより *M. genitalium* の検出を試みた。さらに、上記それぞれの株のDNAコピー数をMgPa PCR法にて測定し、さらに抽出したDNAを段階希釈し、Anyplex systemより *M. genitalium* が検出できうる検出保障限界(最低検出DNAコピー数)を検出した。上記研究にて使用した株は、以下の17株である。標準株：G37、臨床分離株：M2282, M2300, M2321, M2341(デンマークより検出)、M6257, M6280, M6285, M6286, M6328, M6489(スウェーデンより検出)、M6090, M6151(フランスより検出)、M6282, M6283, M6284, M6287(日本より検出)。また、DNA検出法はChelex法、QIAGEN法、GeneAll法の3方法であり、GeneAll法はAnyplex systemの標準法である。

## C. 研究結果

**研究1**：17株より3種のDNA抽出法にて抽出したDNAをAnyplex systemにて*M. genitalium*の検出を行い、すべての検体で検出可能であった。

**研究2**：それぞれの株をGeneAll法にて抽出した場合の検体中のDNA数は、MgPa realtime PCR法で検討するとおおむね $10^6 \sim 10^7$  DANコピー/検体であった。これらの10倍希釈した希釈系を作成し、それぞれの希釈系をAnyplex systemにて*M. genitalium*の検出を行った。 $10^4 \sim 10^7$ 倍希釈した検体で*M. genitalium*が検出され、計算上最低検出DNAコピー数は0.303~48.4コピー数であった。13株の希釈系では0.303~6コピーで検出可能であったが、4株の希釈系では10.7~48.4コピーで検出可能であった。

株名	検出限界DNA コピー数 (geq)
G37	3.07
M2282	2.12
M2300	17.5
M2321	0.303
M2341	3.03
M6257	2.49
M6280	1.05
M6285	1.34
M6286	48.4
M6328	10.7
M6489	0.875
M6090	1.44
M6151	6
M6282	0.86
M6283	1.85
M6284	1.47
M6287	12.9

## D. 考 察

Anyplex systemはすでに海外の数か国で運用が開始されている検査法である。Seegene社はわが国への参入の希望があり、今後、保険適用となればわが国で使用可能な検査法だと考えられる。

今回の検討では、本システムが複数の*M. genitalium*株が検出できることが確認された。近年、複数の検出システムによる*M. genitalium*の検出が市販されているが、いずれも標準株の検出によりその方法の有用性が報告されている本法は臨床検体を含む17株が検出されることが証明された初めての検査法である。本システムの対象遺伝子はgyrB遺伝子あり、MgPa realtime PCR法の対象遺伝子はMgPaである。それぞれ変異の少ない遺伝子であるが、2つの異なる対象遺伝子の核酸増幅法で同じ結果が出たことは、Anyplex systemの精度を証明することとなった。

今回の検討でAnyplex systemによる最低検出限界を算出することができた。核酸増幅法では1遺伝子にて検出が可能であるが、本研究では1株の希釈系で48コピーが検出限界であった。ほとんどの株では数コピーでの検出は可能であったが、最低保障検出限界は約50コピー/1検体という結論に達した。

## E. 結 論

Anyplex systemは複数の*M. genitalium*株を検出することが確認できた。1検体中に約50コピー以上のDNA数が存在すれば、*M. genitalium*が検出できることが分かった。

今後は、prospectiveな臨床研究を行い、本システムの有用性を検討する必要がある。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- (1) 濱砂良一・松本哲朗・藤川利彦：性感染症関連微生物7種同時検出キットによる *Mycoplasma genitalium* の検出，日本性感染症学会第27回学術大会，2014. 12月，神戸.

## *Mycoplasma genitalium*検査の実用化

産業医科大学 泌尿器科

松本哲朗・濱砂良一

*Mycoplasma genitalium*は尿道炎、子宮頸管炎の原因微生物であることは、数多くの研究にて証明されている

近年、*M.genitalium*による尿道炎のアジスロマイシンおよびキノロンによる治療失敗例が世界中から報告され、クラミジア性尿道炎とマイコプラズマ性尿道炎を区別して治療する必要性が高まった。

従って、わが国における*M.genitalium*検査の実用化は急務である。

## ***M.genitalium*検査の世界の動向**

Bio-rad system (フランス)	USAで申請中	Target 未発表
Seegene (Anyplex system, 韓国)	ドイツで申請中	<i>gyrB</i>
TMA (オーストラリア)	USAで申請中	未発表
AmpliSens PCR (ロシア)		未発表
三菱メディエンス (16S rRNA, multiplex)	わが国, 自費にて	16S rRNA
<b>Version up?</b>		
Real-time PCR for <i>mgpa</i> gene (Denmark, JS Jense)	北欧でスタンダード法	<i>MgPa</i> gene
16S rRNA PCR (Denmark, JS Jensen)		

わが国への参入を希望しているSeegene社のAnyplex systemの*M.genitalium*の基礎的研究を行った。

- 1) Type strain以外の臨床分離株に対する反応
- 2) 上記臨床分離株を使用して、本systemの検出保障限界を明らかにする

# 方法

## *M.genitalium*検出法

MgPa法 (Jensen J Clin Microbiol, 42: 683-692, 2004)

Target gene: MgPa adhesion gene

検出法はrealtime PCR法 (Applied Biosystem 7300にて測定)

Anyplex system (Seegene社)

Target gene: gyrase gene

検出法はrealtime PCR法 (CFX96, Bio-Radにて測定)

- ① *M.genitalium*株から3方法の抽出法 (Chelex法、QIAGEN法、GeneAII法)にてDNAを抽出し、MgPa法にてDNAコピー数を測定
- ② それぞれの株から抽出したDNAをAnyplex systemにて測定
- ③ さらに、DNA抽出液をそれぞれ10倍希釈し、Anyplex systemにて、その検出保障限界を測定した

# 方法

対象: *M.genitalium* 17株

標準株 G37

臨床分離株

M2282, M2300, M2321, M2341 (デンマーク)

M6257, M6280, M6285, M6286, M6328, M6489 (スウェーデン)

M6090, M6151 (フランス)

M6282, M6283, M6284, M6287 (日本)

## 結果(1)

株名	MgPa法		Anyplex法		P:positive
	Chelex法	Chelex法	Qiagen法	GeneAll法	
G37	P	P	P	P	
M2282	P	P	P	P	
M2300	P	P	P	P	
M2321	P	P	P	P	
M2341	P	P	P	P	
M6257	P	P	P	P	
M6280	P	P	P	P	
M6285	P	P	P	P	
M6286	P	P	P	P	
M6328	P	P	P	P	
M6489	P	P	P	P	
M6090	P	P	P	P	
M6151	P	P	P	P	
M6282	P	P	P	P	
M6283	P	P	P	P	
M6284	P	P	P	P	
M6287	P	P	P	P	

すべての株から3通りの方法でDNA検出を行い、Anyplex法で*M.genitalium*が検出可能であった

## 結果(2)

株名	抽出法	DNAコピー数 (geq)	P:positive N:negative							
			10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
G37	GeneAll	30753075	P	P	P	P	P	P	P	N
	QIAGEN	22650000	P	P	P	P	P	P	N	N
M2282	GeneAll	21150000	P	P	P	P	P	P	P	N
	QIAGEN	14850000	P	P	P	P	P	P	P	N
M2300	GeneAll	17800000	P	P	P	P	P	P	N	N
	QIAGEN	10650000	P	P	P	P	P	P	P	P
M2321	GeneAll	30300000	P	P	P	P	P	P	P	P
	QIAGEN	24800000	P	P	P	P	P	P	P	N
M2341	GeneAll	16550000	P	P	P	P	P	P	P	N
	QIAGEN	10450000	P	P	P	P	P	P	N	N
M6257	GeneAll	24900000	P	P	P	P	P	P	P	N
	QIAGEN	4425000	P	P	P	P	P	P	N	N
M6280	GeneAll	10450000	P	P	P	P	P	P	P	N
	QIAGEN	6100000	P	P	P	P	P	P	N	N
M6285	GeneAll	13350000	P	P	P	P	P	P	P	N
	QIAGEN	4285000	P	P	P	P	P	N	N	N
M6286	GeneAll	4835000	P	P	P	P	P	N	N	N
	QIAGEN	10650000	P	P	P	P	P	P	P	N

## 結果(2)

P:positive  
N:negative

株名	抽出法	DNAコピー数 (geq)	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
M6328	GeneAll	10650000	P	P	P	P	P	P	P	N
	QIAGEN	10650000	P	P	P	P	P	P	P	N
M6489	GeneAll	8750000	P	P	P	P	P	P	P	N
	QIAGEN	7500000	P	P	P	P	P	P	N	N
M6090	GeneAll	14400000	P	P	P	P	P	P	P	N
	QIAGEN	16650000	P	P	P	P	P	P	P	N
M6151	GeneAll	6000000	P	P	P	P	P	P	N	N
	QIAGEN	5550000	P	P	P	P	P	P	N	N
M6282	GeneAll	8600000	P	P	P	P	P	P	P	N
	QIAGEN	7450000	P	P	P	P	P	P	P	N
M6283	GeneAll	18500000	P	P	P	P	P	P	P	N
	QIAGEN	5850000	P	P	P	P	P	P	P	N
M6284	GeneAll	14650000	P	P	P	P	P	P	P	N
	QIAGEN	10050000	P	P	P	P	P	P	P	N
M6287	GeneAll	12850000	P	P	P	P	P	P	P	N
	QIAGEN	7650000	P	P	P	P	P	P	P	N

## 結果(3)

株名	検出限界DNAコピー数 (geq)
G37	3.07
M2282	2.12
M2300	17.5
M2321	0.303
M2341	3.03
M6257	2.49
M6280	1.05
M6285	1.34
M6286	48.4
M6328	10.7
M6489	0.875
M6090	1.44
M6151	6
M6282	0.86
M6283	1.85
M6284	1.47
M6287	12.9

4株 : 11-48 geq/1反応系  
13株 : 1-6 geq/1反応系  
(geq:genome equivalent)



多くの株では、10コピー以下で検出可能であった。  
しかし、4検体では1検出限界が10コピー以上であり、本キットの検出保障限界は、おおよそ50geqと判断した



## まとめ

- Anyplex systemは*M.genitalium*17株の検出に有効であり、検出保障限界がおおよそ50コピーであることが判明した。
- 今後は、prospective な臨床研究を行う予定である。

## 淋菌の分子タイピング、耐性検索に関する研究

【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)

石原 朋子 (国立感染症研究所)

志牟田 健 (同 上)

中山 周一 (同 上)

### 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。1995～2005年に関東地域で分離された淋菌株690株のうち、370株の分子タイピング解析を行なった。その結果、セフィキシム低感受性/耐性株がシングルクローナルな拡散から、マルチクローナルな拡散に移行したことが確認された。セフトリアキソン耐性株が出現して約5年が経つ。いまだその拡散の兆しは認められないが、拡散が認められた時には速やかに広がる危険性がある。

### 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、以前第1選択薬であったCFMに対する耐性菌がはじめて分離報告された1995年とその後10年間に神奈川県内で分離された690株のうち、370株の詳細な解析を行うことで、拡散の実態を検討することを目的とした。

### 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690株を用いた(表1)。薬剤感受性試験はセフィキシム(CFM)に対して平板希釈法を用いて実施した。分子タイピングには370株を供試した。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。

**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。

## C. 研究結果

### 1 セフィキシム低感受性/耐性株の出現と広がり

1995年分離34株のうち、1株はCFMの最小発育阻止濃度(MIC)が0.25 µg/mlを示した(表1)。これまでの報告と比較では、CF耐性(CFM-R)株の最も古い分離時期である1999年よりも4年遡ることとなった。また、別の1株がCFMのMICが0.125 µg/mlであり低感受性(CFM-DS)を示した。1996年分離70株中にはこのようなCFM-DS/R株は分離されていないが、1997年に再び1株(88株中)がCFM-Rを示した(表1)。

1998年以降、CFM-DS/R株の分離は増加し2002年には57.1%の分離株が耐性を示す株であった(表1)。

### 2. 耐性遺伝子のタイピング

淋菌のCFM等のβ-ラクタム剤に対する耐性は細胞壁合成に関与するペニシリン結合タンパク2(PBP2)の変異によるものが主流となる。変異が導入されることで薬剤への結合親和性が減弱することで、耐性が発揮される。淋菌のCFM耐性はPBP2のモザイク

型変異(他のナイセリア属菌からの耐性型PBP2遺伝子の一部を水平伝播により獲得)と点変異によるものが知られている。現在、世界各地で蔓延するCFM-DS/R株の多くは、2種類のモザイク型変異株であることが知られている。

1995年分離CFM-R株はストック株が既に死滅しており解析ができなかったが、1995年CFM-DS株および1997年CFM-R株のPBP2遺伝子の配列決定およびMLST解析を行った。1995年CFM-DS株は点変異型の耐性PBP2遺伝子(PBP2 XIII型)であり、系統的にはMLST7365に属していた。一方で、1997年CFM-R株はモザイク型PBP2(PBP2 X型)をもつ、MLST7363に属する株であった。

PBP2 X型を持つ耐性株は世界的に広く拡散した株の代表であり、系統的にはST7363に属するものが多いことが知られている。本研究でその最も古い株が1997年に分離されていたことが示された。

### 3. CFM-DS/R株のクローナルな拡散

1998年以降CFM-DS/R株の分離率が高まったことから(表1)、1998~2002年分離株については、解析可能であった全ての株(n=294)についてMLST解析を実施した。また、2003~2005年分離株についてはCFM-DS/R株(n=76)を実施した。

370株のMLST型は、52種の型に分類された。多様性指数(Diversity index:DI)は0.825であった。CFM-DS/R株は17種の型に分類され、DIは0.539であった。セフィキシム感受性株(CFM-S)のDIは0.901であった。DIは、その集団の全ての株がそれぞれ固有の型を示す場合、その値は1を示し、多様性が高いことを示す。CFM-DS/R株集団の多様性

は、CFM-S株集団に比較して明らかに低い値を示したことから、遺伝的な偏りがあることが示唆された。

1998～2002年分離株の中で、最も高頻度に分離されるMLST型はST7363であり、その頻度順はCFM-DS/R株およびCFM-S株においても第一位であった。しかしながら、それぞれの集団の中での分離頻度はCFM-S株の場合221株中40株、CFM-DS/R株の場合73株中53株と、有意にCFM-DS/R株において占める割合が高かった。2003～2005年分離CFM-DS/R株の占める割合も76株中46株と高かった。

1998～2005年分離CFM-DS/R株 ( $n = 149$ ) のPBP 2 遺伝子の配列を決定した。12種の異なるPBP 2 型を保持する株が見いだされた(図1)。そのうち9種はモザイク型であり、3種が点変異型であった(PBP 2 VII, XI, XIII各1株)。CFM-DS/R株の中で最も高頻度に見られたPBP 2 型はPBP 2 X型であった(129/149 : 86.6%) (表2)。さらにPBP 2 X型の1アミノ酸置換変異体(XXIV, XXX, XXXI型)がそれぞれ1株、2株、1株から見いだされた。モザイク型PBP 2 を保持する残り13株中、7株はPBP 2 XXXIV型あるいはその1アミノ酸置換変異型であり、6株はPBP 2 XXVI型であった。

1997年分離株(ST7363/PBP 2 X型)と遺伝的に類似する株( $n = 93/149$  CFM-DS/R株, 62.4%)が本地域で1998～2005年の間に拡散したことが示唆された。

#### 4. MLST7363/PBP 2 X以外の CFM-DS/R株

149株のCFM-DS/R株のうち、56株はMLST7363/PBP 2 Xとは異なる遺伝的性状を示し

た(表2)。うち6株がMLST7363に属するがPBP 2 X型以外のものであった。うち2株はPBP 2 Xの1アミノ酸置換型(PBP 2 XXX型)であり、4株がPBP 2 XXXIV型あるいはその1アミノ酸置換変異型(各3株および1株であった)。MLST7363/PBP 2 X株において、PBP 2 X遺伝子に点変異あるいは新たなモザイク型変異が導入された株であることが示唆された。

また、50株がMLST7363以外の16種のMLST型に属していたが、このうち6種のMLST型はMLST7363と1遺伝子座の1塩基置換であることから、MLST7363から派生したMLST型であることが示唆された。これらのMLST型を示す株は19株存在し、全てがPBP 2 X型の遺伝子を保持していたことから、MLST7363/PBP 2 X株から派生したことが示唆された。

残りの31株のうち3株は点変異型のPBP 2 遺伝子を保有しており、MLST7363/PBP 2 X型の菌株とは独立して出現した菌株であることが予測された。さらに28株中、14株はMLST1901に属する菌株であった。ST1901はST7363と比較すると3遺伝子座が異なるST型である。PBP 2 型は10株がPBP 2 X型かその1アミノ酸置換型、3株がPBP 2 XXXIV型の1アミノ酸置換型、1株が点変異型であった。ST7363型株が保持するPBP 2 X型遺伝子の水平伝播で形成されたことが既に強く示唆されている(Ohnishi M et al. AAC 2010, 54, 1060-1067)。同様にPBP 2 XXXIV型もST7363で見いだされており、ST7363からST1901へPBP 2 XXXIV型が水平伝播した可能性が示唆された。また、MLST1910型と1遺伝子座のみの相違をしめす、3種のMLST型に属する3株も、PBP 2 X型を保持しており、

ST1901からの派生したものである可能性が高い。

最後に残された11株のうち5株はPBP 2 X型遺伝子を保持しており、PBP 2 X遺伝子の水平伝播あるいは、MLST 遺伝子座の変異によって形成された可能性があるが、詳細については今後の検討が必要である。

注目すべき点として、最後に残された6株は同一のMLST型 (ST7358)に属し、その遺伝子座の比較からもMLST7363、MLST1901からは遺伝的には離れていた。また、PBP 2型も他のCFM-DS/R株には見られないXXVI型を保持しており、独立して形成されたCFM-DS/R株であることが示唆された (表2, 図1)。

#### D. 考 察

本研究において、PBP 2 X型をもつMLST7363株が1997年に出現し、それが1998~2005年間に拡散したことが示された。同時に、MLST7363株の中に、異なるPBP 2型 (XXXIV) を保持する株が出現したこと、MLST1901株のなかで、PBP 2 X型およびPBP 2 XXXIV型、およびその1アミノ酸置換型が2005年までに出現したことが示された。

現在世界各地で分離されるCFM-DS/R株を大きく分けて2種類に大別される。そのうちの 하나가MLST7363型に属し、PBP 2 X遺伝子を保持するものであり、他方がPBP 2 XXXIVを保持するMLST1901型株である。PBP 2 X遺伝子を保持するMLST7363型株の海外での最初の分離は2002年であり、今回の解析で同一の性状を示す菌株が5年早く国内で分離されていたこと、また2002年以前に少なくとも神奈川地域では既にこの型のCFM-

DS/Rが蔓延していたことが示唆された。また、PBP 2 XXXIVを保持するMLST1901型株は2008年に米国で最初に分離されたものであり、現在の最も広く世界各地で分離されるCFM-DS/R株である。MLST1901に属するCFM-DS/R株は2000年に国内で分離されていたことが本研究で示された。しかし、そのPBP 2型はPBP 2 Xであり、MLST7363株からの水平伝播によるものであることが強く示唆されている。興味深いことに、MLST1901に特有であると考えられていたPBP 2 XXXIV型の遺伝子が国内では古くからMLST7363型の菌株が保持していたことが示されたことである (2003年)。おそらく、PBP 2 XXXIV型遺伝子もMLST7363型の菌株からMLST1901型の菌株に水平伝播したことを示唆する事実である。本研究では、PBP 2 XXXIV型遺伝子を保有するMLST1901株は見いだせなかったが、MLST1901型株がPBP 2 XXXIVの1アミノ酸置換型の遺伝子を保有していることが示された (2003年分離株)。本株の更に詳細な遺伝子解析から、現在世界でも最も蔓延していると考えられるPBP 2 XXXIVを保持するMLST1901型と区別できない遺伝的性状をもつことが示されており、2003年時点で既に出現していた株がその後世界伝播したことが示唆されている。

#### E. 結 論

淋菌の薬剤耐性 (低感受性株) がはじめての出現から数年のうちに地域内拡散したことが示された。クローナルな拡散—ある特定の遺伝的性状をもつ菌株 (MLST7363型であり、かつPBP 2 X遺伝子保有) の拡散したことが示された。同時に、耐性遺伝子の水平伝播に

より遺伝的な多様な菌株が耐性を獲得したことも同時に示すことができた。異なる系統（ここでは主に、MLST7363からMLST1901）への耐性遺伝子が伝播されることにより、拡散伝播ルートが拡大された可能性がある。CFM-DS/Rの世界的拡散は大きく2つの波が存在していたことが想像されている。第1波はPBP 2 X遺伝子を保持するMLST7363型株によるものであり、第2波はPBP 2 XXXIVを保持するMLST1901型株によるものであると考えられている。いずれも、国内で最も早く分離されていることが示された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

- (1) Morita-Ishihara T, Unemo M, Furubayashi K, Kawahata T, Shimuta K, Nakayama S, Ohnishi M. Treatment failure with 2 grams azithromycin (extended-release formulation) in gonorrhoea in Japan caused by the international multidrug-resistant ST1407 strain of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrobial Chemother* 2014, 69, 2086-90.

### 学会発表

- (1) 大西 真. セフトリアキソン耐性淋菌：世界が注目する耐性菌. 耐性菌シンポジウム2014 —1年を総括して来年に備える—, 平成26年12月, 東京都.
- (2) 大西 真. 淋菌：この変幻自在な性感染症原因菌. 日本性感染症学会, 第27回学

術大会. 平成26年12月, 神戸市.

- (3) Makoto Ohnishi. Emergence of ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. 11<sup>th</sup> Japan-Taiwan Symposium on New Technologies Applied to Public Health Including Food-borne Diseases and Drug Resistance 2014 Sep. Taipei, Taiwan.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 セフィキシム低感受性および耐性株の分離状況 (1995～2005年分離株)

Year	Number of isolates <sup>1</sup>	CFM-DS/R2	
		No. <sup>1</sup>	%
1995	34 (1)	2 (1)	5.9
1996	70 (0)	0	0
1997	88 (1)	1 (1)	1.1
1998	89 (84)	5 (5)	5.6
1999	69 (50)	5 (5)	7.2
2000	54 (49)	12 (10)	22.2
2001	102 (90)	44 (41)	43.1
2002	21 (21)	12 (12)	57.1
2003	55 (27)	31 (27)	56.4
2004	74 (34)	39 (34)	52.7
2005	34 (15)	18 (15)	52.9

<sup>1</sup>Number of isolates examined genetically is provided in parenthesis.

<sup>2</sup>MIC 0.125 mg/L of cefixime-decreased susceptibility, MIC >0.125 mg/L cefixime resistance, or MIC 0.125 mg/L of ceftriaxone cefixime-decreased susceptibility.

表2 セフィキシム低感受性および耐性株のMLST型およびPBP 2遺伝子の多様性

MLST <sup>1</sup>	n =	X	PBP 2 allele										
			PBP 2 X family			PBP 2 XXXIV family							
			+	+	+	+	+	+	+	XXVI	VII	XI	XIII
			E101D (XXIV)	A501V (XXX)	A532V (XXXI)	XXXIV	P551L (XXXII)	+A486 V	P551Q				
7363	99	93		2		3	2	1					
1901	14	9	1						1				1
1596	13	13											
7358	6									6			
1588	2	2											
1590	2				1						1		
7371	2	2											
11052	2	2											
1579	1	1											
1600	1	1											
7356	1	1											
7367	1	1											
7827	1	1											
8153	1	1											
10631	1	1											
10633	1												1
10634	1	1											

図1 PBP 2 のアミノ酸配列比較 ( )内に分離菌株数を示した。

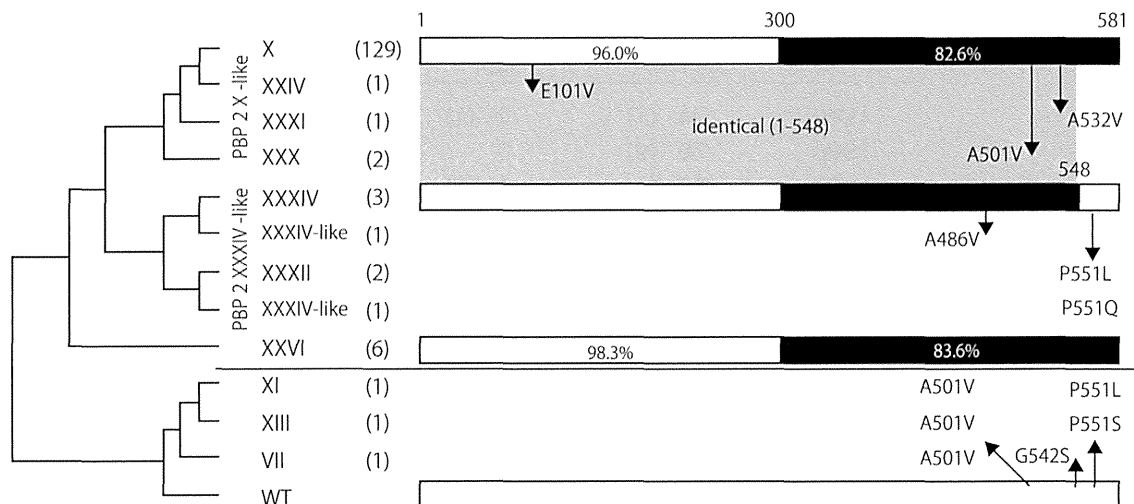
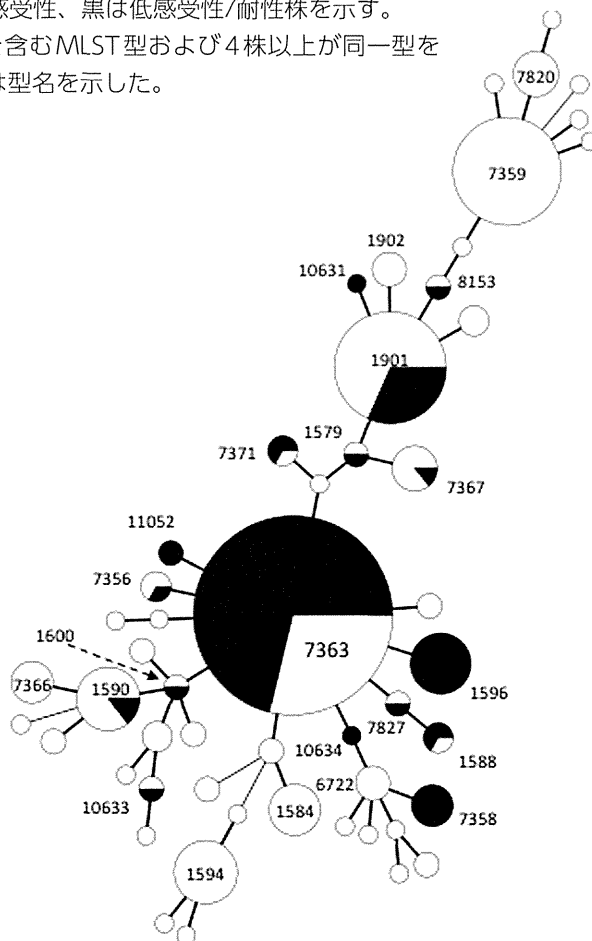


図2 淋菌のMLST型のミニマムスパンツリー図

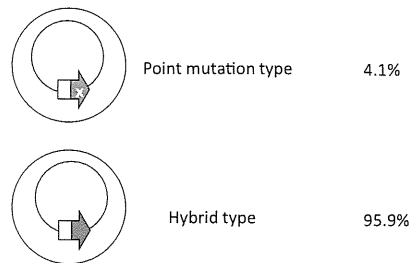
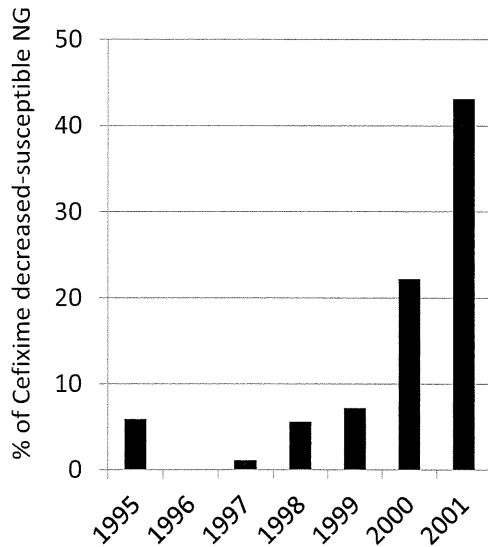
白はセフィキシム感受性、黒は低感受性/耐性株を示す。  
 低感受性/耐性株を含むMLST型および4株以上が同一型をしめたMLST型は型名を示した。





# 薬剤耐性淋菌の時空間的な広がり

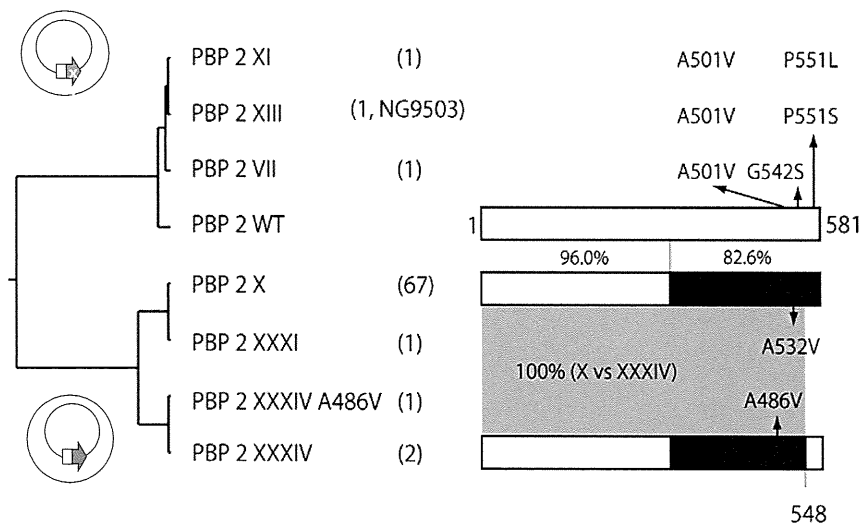
第一選択薬であるセフトリアキソン耐性株の拡散が危惧されている  
 約15年前に出現した、一世代前の耐性淋菌 セフィキシム耐性株の拡散の様子を  
 分子タイピングデータを加味して解析



大別して、2つのセフィキシム耐性株が出現し  
 5年程度の比較的低分離率(~10%)の機関  
 の後に、爆発的に蔓延。  
 耐性遺伝子としてはハイブリット型が優位で  
 あった。

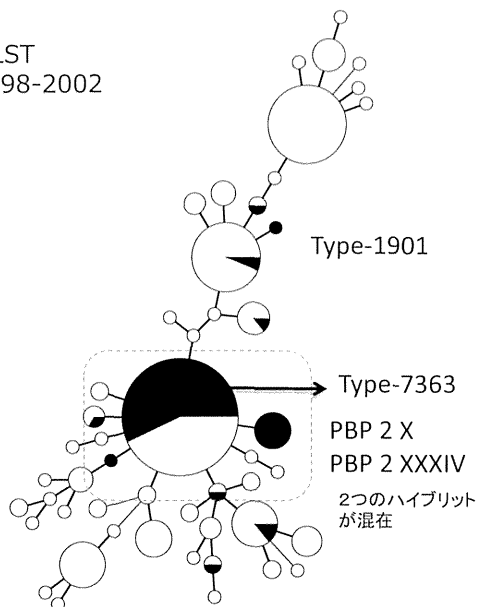
## 2つのハイブリット型耐性遺伝子の混在

セフィキシム耐性株は点変異型および他の細菌から遺伝子の一部を獲得したハイブリット型のペニシリン結合タンパク遺伝子を保有する。2000年代後半に世界的に拡散したPBP 2 X型が既に1997-2002年に国内では蔓延していたこと、その亜型であるPBP XXXIV型(2008年米国分離がこれまでの最も古い報告)に10年程度先駆けて国内で出現していたことが示された。



# 薬剤耐性淋菌の時空間的な広がり

MLST  
1998-2002



MLST解析(系統解析)からは2000年代後半世界的に拡散した2つの系統、ST7363およびST1901、の耐性株が存在していたが、ST7363が優位。

遺伝子型、耐性遺伝子型の多様性が増加させながら耐性株が広がっていく様子が観察された

セフトリアキソン耐性株もすでに、点変異型および新規ハイブリット型をもつものが出現している(2009, 2010)。

本研究で示したセフィキシム耐性株の拡散のタイムラインから、セフトリアキソン耐性株の広がりリスクが高まっている可能性が示唆され、十分な監視と第1選択薬の変更の準備は必要である。

# 耳鼻咽喉科外来における咽頭の淋菌・クラミジア検査に関する研究

【研究分担者】 余田 敬子（東京女子医科大学東医療センター耳鼻咽喉科）

## 研究要旨

全国10箇所の耳鼻咽喉科施設において、口内炎、咽頭炎、扁桃炎、咽喉頭異常感などの患者、または咽頭の性感染症検査希望者で、研究参加に同意の得られた18歳～59歳の男女を対象に、咽頭および上咽頭の淋菌・クラミジア検査を実施したうち、平成26年2月20日～平成27年2月2日の間の実施者の結果を検討した。

男性84人、女性78人の計163人に実施され、11人の咽頭から淋菌が、7人の咽頭からクラミジアが検出された。淋菌・クラミジアの同時検出例はなかった。検体別にみた淋菌・クラミジアの陽性結果は、淋菌の陽性検体数は中咽頭および上咽頭スワブが8検体で、うがい液は6検体が陽性であった。クラミジアの陽性検体数は、うがい液が6検体陽性で、中咽頭スワブが5検体および上咽頭スワブが4検体陽性であった。

今後は、核酸増幅法の検出性および臨床像と、扁桃の解剖学的構造や扁桃疾患との関連性について検討を行う必要があると考えられた。

## A. 研究目的

日本における性感染症発生动向調査のなかで患者報告数が最も多い性器クラミジア感染症の原因である *Chlamydia trachomatis*（以下、クラミジア）と、次いで多い性器淋菌感染症の原因である *Neisseria gonorrhoeae*（以下、淋菌）は、どちらも、性器や咽頭に感染していても無症状のまま経過する無症候性感染者が増加している。他覚的所見にも乏しい無症候性感染者の潜在的存在が、クラミジア感染症と淋菌感染症が蔓延する大きな要因と推察されている。

淋菌とクラミジアは共通して、ヒトの尿道、子宮頸管、結膜、咽頭にも感染することから、最近の性行動の多様化に伴いオーラルセックスを介して淋菌およびクラミジアが咽頭に感

染する者の増加も指摘されている。これまで、淋菌・クラミジアの咽頭感染も自覚症状や他覚的所見を欠く無症候性感染が圧倒的に多いことが示されてきた。しかし、これまでの淋菌・クラミジアの咽頭感染に関する検討のほとんどが、泌尿器科または婦人科で性器の淋菌・クラミジア陽性者や性風俗従業女性を対象とした結果で、咽頭疾患を専門に扱う耳鼻咽喉科の切り口からその臨床像を詳細に検討した報告は少ない。

この研究では、口内炎、咽頭炎、扁桃炎、咽喉頭異常感症などの咽喉頭疾患にて耳鼻咽喉科外来を受診する人の中に、淋菌およびクラミジア感染者がそのくらい存在するのか、また検査結果陽性者の口腔咽頭所見、患者背景、感染源などの臨床像や、症状や咽喉頭疾患との関連性を検討する。また、検査陽性者

については、陽性結果の再確認と、治療後の治癒確認を行い、感染の確認と、治療方法の適合性も検討する。

## B. 研究方法

### 1. 対象

耳鼻咽喉科外来に、口内炎、咽頭炎、扁桃炎、咽喉頭異常感などの咽頭疾患または咽頭症状を訴えて受診した人、咽頭の性感染症検査を希望して受診した人のうち、本研究への参加を文書にて承諾を得られた18歳～59歳の男女を対象とする。

### 2. 検査方法

【検体】①咽頭スワブ、②上咽頭スワブ、  
③うがい液

#### 【検査方法】

検体採取の順序は、先に①②を採取したのちに③を採取する。

検体①②は核酸増幅検査のSDA法<sup>\*</sup>、検体③は核酸増幅検査のPCR法<sup>†</sup>をもちいて（図1）、淋菌（*Neisseria gonorrhoeae*）およびクラミジア（*Chlamydia trachomatis*）を検出する。

\* SDA (Strand Displacement Amplification) : BD ProbeTec ET/GC

†リアルタイムPCR (Polymerase chain reaction) : コバス<sup>®</sup> 4800システム CT/NG

#### 【検査実施プロトコール】

1. 検査希望者全員から、①咽頭スワブ、②上咽頭スワブ、③うがい液、を採取して、SDA法とPCR法にて淋菌とクラミジアの検査を行う。

2. 陽性者においては、その結果の説明時

(値要開始前)に検出された病原体について、SDA法とPCR法にて再検査を行い、感染を確認する。淋菌陽性者については、淋菌培養（岐阜大 安田先生）を追加する。

3. 陽性者においては、治療開始から淋菌では1週間、クラミジアでは2週間以上あけて、治癒確認のための検査をSDA法とPCR法にてを行う。治療内容は、淋菌はセフトリアキソン（ロセフィン静注用 [1 g]）を2 g/回、1回/日、1～3日間点滴静注、クラミジアはアジスロマイシン（ジスロマックSR）2 g/回を1回内服、またはクラリスロマイシン（クラリス・クラリシッド錠 [200mg] 200mg/回、分2回、14日間投与した。

4. 淋菌陽性症例は、陽性結果来院時に再度扁桃陰窩スワブを採取し、岐阜大泌尿器科にて淋菌培養と遺伝子検査を追加する。

### 3. 被験者の同意

研究開始前に、研究内容および研究に関する事項について、本学倫理委員会にて承認（東京女子医科大学倫理委員会承認 2030番）された説明文書を用いて口頭で説明を行い、文書にて研究参加の同意を得た。

### 4. 検査実施施設（図2，表1）

- 1) 東京女子医科大学東医療センター耳鼻咽喉科（東京都荒川区）
- 2) 杉田耳鼻咽喉科（千葉県千葉市）
- 3) かみで耳鼻咽喉科（静岡県富士市）
- 4) 松原耳鼻いんこう科医院（岐阜県関市）
- 5) 渡辺耳鼻咽喉科・アレルギー科クリニック（静岡県熱海市）
- 6) とも耳鼻科クリニック（北海道札幌市中央区）