

3年間のまとめ

H24・25・26

分担研究者 白井千香

核酸増幅検査によるうがい液検査

CT: chlamydia trachomatis NG: neisseria gonorrhoeae

1. 保健所夜間HIV検査受検者における、うがい液検査の一致率

<i>CT</i>	SDA+	SDA-	total	Concordance
TMA+	2	1	3	positive 66.7% (2/3)
TMA-	1	236	237	negative 99.6% (236/237)
total	3	237	240	Total 99.2% (238/240)

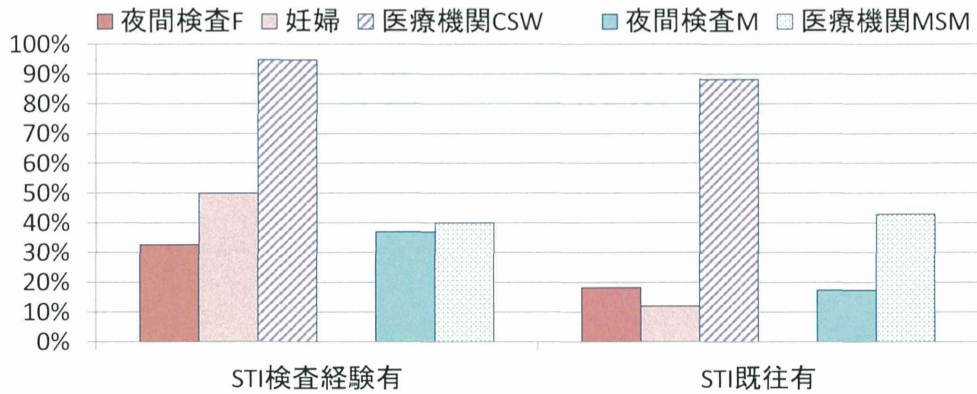
<i>NG</i>	SDA+	SDA-	total	Concordance
TMA+	6	1	7	positive 85.7% (6/7)
TMA-	9	224	233	negative 96.1% (224/233)
total	15	225	240	Total 95.8% (230/240)

2. 受診対象者別 うがい液検査陽性割合

受診対象者 (検査法)	夜間検査F 126人 (TMAかつSDA)	妊婦 50人 (RT-PCR)	CSW 77人(リアル タイム-PCR)	夜間検査M 114人 (TMAかつSDA)	MSM 35人(リアル タイム-PCR)
CT 陽性率	1.6%	2.0%	3.9%	0.8%	0%
NG 陽性率	1.6%	0%	1.3%	4.4%	5.7%

うがい液検査受診者の性行動アンケート

受診対象者別 口腔性感染症の知識や性行動	夜間検査 F 126人	妊婦 50人	CSW 77人	夜間検査 M 114人	MSM 35人
性感染症はオーラルセックスで感染すると知っている	75%	48%	97%	83%	71%
フェラチオの経験	89%	76%	96%	96%	94%



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ている。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。また、アジスロマイシン治療失敗症例分離株の詳細な解析を実施した。アジスロマイシン耐性株はセフトリアキシソンのMICは比較的低いことが示されたが、遺伝的にはセフトリアキソンに対して比較的高いMICを示すMLST1901, NG-MAST1407であったため、セフトリアキソン低感受性株であるMLST1901, NG-MAST1407株がアジスロマイシン耐性を獲得する可能性が示唆された。

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、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 1：神奈川県衛生研究所収集された1999～2001年に分離された182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。薬剤感受性試験はPCG, CFM, CROの3剤に対して平板希釈法を用いて実施した。

菌株 2：上記菌株を含む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。

菌株 3：京都・大阪における泌尿器科クリニックにおいて分離された菌株に関する410株について解析を行った。薬剤感受性試験はEtestを用いて実施した。アジスロマイシンのMICが1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の株を耐性株とした。

系統解析：神奈川株に関しては、分子タイピングに370株を供試した。また、京都・大阪株に関しては、アジスロマイシン耐性株を解析した。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。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の同一性を解析した（Martin IM et al. 2004）。

Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) 解析はHeymans Rらの方法に準じて実施した。（Heymans R, et al. 2011 J Clinical Microbiol）

アジスロマイシン耐性に関与する23S rRNA 遺伝子の塩基配列決定はNgらの方法を用いた。（Ng LK, et al. 2002 AAC）

C. 研究結果

1. 1999～2001年分離株の解析

(1) 薬剤感受性

1999年から2001年にかけて、PCG, CFM, CROの3つの β -ラクタム剤全てに対してMIC分布はより高い方向に移動した。詳細は平成24年度分担報告書に記載したので、その概要を以下に示した。

1999年分離株のPCGに対するMICは、0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示す菌株が多く、二峰性のピークを示した。2001年分離株はMIC 2～4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示す菌株が50%以上を占めた。

CFMに対しては1999年分離株のMICは、0.008 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満を示す株が約1/3を占め、MIC 0.016 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の菌株が80%程度を示した。2000年分離株では、MIC 0.016以下の菌株は60%程度であり、MIC 0.031 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の菌株の増加が見られた。2001年分離株においては、MIC 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示す株が増加しピークを形成し、全体の30%を占めていた。

CROに対してのMIC分布は、1999年分離株はMIC 0.016 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示す株が60%を占めた。2000年、2001年にかけてMIC 0.016 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下を示す菌株の割合は減少し、2000年分離株はMIC 0.063 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示す菌株がピークを形成し、2001年株ではMIC 0.031～0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にかけて

よりブロードなピークを形成した。

(2) MLST解析

解析した182株は28ST型に分類された(表2)。MLST7363, MLST1901, MLST7359に属する株がそれぞれ56(30.8%), 24(13.2%), および23株(12.6%)存在した。

MLST1901菌株は、1999~2001年の3年間に急激に分離頻度が高まったST型であることが示された。1999年には1株のみであったが、2000年および2001年には第2位の占有率を占めた。MLST7359は1999年にはST7363菌株と同等の頻度で分離されていたが、その頻度は緩やかに減少した。

(3) MLST型別と薬剤感受性

1999~2001年の間に分離される頻度が減少したST7359に属する菌株はPCG, CFM, CROのいずれの薬剤にも感受性傾向が高いことが示された。一方で最も分離株数が多く、研究対象期間において増加傾向が認められたMLST7363株は、3薬剤のいずれに対するMIC分布は2あるいは3峰性を示した。PCGに対してはMIC0.25~0.5 $\mu\text{g/ml}$ および2~4 $\mu\text{g/ml}$ を示す菌株の2群に分けられる。同様に、CROに対しても0.016 $\mu\text{g/ml}$ 未満、0.031~0.125 $\mu\text{g/ml}$ のMICを示す2群に分けられた。CFMに対しては、より明確にMIC分布多峰性が観察された。0.008 $\mu\text{g/ml}$ 未満、0.016 $\mu\text{g/ml}$ および0.063~0.5 $\mu\text{g/ml}$ のMICを示す3群に分けられた。これらの3群に属する菌株は1999年にそれぞれ既に分離されていたが、2000~2001年は0.016 $\mu\text{g/ml}$ および0.063~0.5 $\mu\text{g/ml}$ のMIC値を示す菌株の増加が認められた(図1)。

ST1901は2000~2001年に急激に分離され

る頻度が高まったMLST型である。この増加はPCGに対してはMIC2~4 $\mu\text{g/ml}$ を示す菌株の増加を主に反映していた。CROに対するMICは0.016 $\mu\text{g/ml}$ 未満および0.016 $\mu\text{g/ml}$ の株も約半数を占め、PCGに対するほど耐性は高くなかった。CFMに対しては、0.008 $\mu\text{g/ml}$ 未満および0.016 $\mu\text{g/ml}$ のMIC値を示す菌株がほとんどであり、特にMIC0.016 $\mu\text{g/ml}$ の菌株が顕著に増加していた。

2 セフィキシム低感受性/耐性株の出現と広がり

セフィキシム低感受性/耐性株が1999~2001年に増加していたことが明らかになったので、解析期間を拡大してセフィキシム低感受性/耐性株に着目してより詳細な解析を行った。詳細は平成26年度分担報告書に記載したので、その概要を以下に示した。

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 $\mu\text{g/ml}$ を示した。また、別の1株がCFMのMICが0.125 $\mu\text{g/ml}$ 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)。

3. 耐性遺伝子のタイピング

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PBP 2 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PBP 2 遺伝子 (PBP 2 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PBP 2 (PBP 2 X型) をもつ、MLST7363に属する株であった。

PBP 2 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。

4. 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。

1998~2005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2)。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 = 93/49 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。

5. 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。PBP2型は10株がPBP2 X型かその1アミノ酸置換型、3株がPBP2 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PBP2 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PBP2 XXXIV型もST7363で見いだされており、ST7363からST1901へPBP2 XXXIV型が水平伝播した可能性が示唆された。

6. アジスロマイシン耐性株の分離頻度

現在第1選択薬としてセフトリアキソンが世界的に使用されている。しかしながら、散発例としてセフトリアキソン耐性株が出現している。そのため、セフトリアキソン耐性株が拡散した後の第1選択薬としてアジスロマイシンの利用が検討されてきた。国内でのアジスロマイシン耐性株の菌株性状解析は十分に進んでいない。そこで京都・大阪地域分離株について解析を行った。詳細は平成25年度報告書に記載した。以下にその概要を示した。

- (1) 2010年4月～2013年3月までに分離した404株中16株がアジスロマイシンのMICが1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であった。
- (2) 治療失敗症例

16株中4株はアジスロマイシン治療(2g 除法製剤)前後に2カ所の異なる解剖学的部位から採取された検体から分離された菌株であった。そこで、MLSTならびにNG-MAST解析を実施し、菌の遺伝学的性状を検討した(表3)。

4株ともにMLST型1901、NG-MAST型1407であることが示された。同一株であるこ

とを更に検証するために、MLVA法において詳細な解析を実施した。その結果、1株を除いて染色体の5カ所(VNTR04-03, VNTR04-10, VNTR07-02, VNTR15-02, VNTR16-01)に存在する反復配列のリピート数はそれぞれ(10-3-21-16-1; 上記の5カ所のVNTR部位順のリピート数)であることが示された。異なるリピート配列を示した1株(治療前の咽頭由来株)も(8-3-21-16-1)であった。つまりVNTR04-03領域の反復配列数が8となる単一部位変化株(Single locus variant)であることが示された。

耐性機構に関しては、23S rRNA遺伝子の変異で説明出来るか検討した。23S rRNA遺伝子の2059位のA>G置換と、2611位のC>T置換によりアジスロマイシン耐性が上昇することが知られている。4株ともに染色体上にある4コピーの23S rRNAに2611位のC>T置換変異があることが示された。

7. MLST型1901/NG-MAST型1407株の比較解析

上記の4株を除いた京都、大阪で分離されたアジスロマイシン耐性を示す12株のうち、7株はNG-MAST型1407に属する菌株であった(表3)。1株を除きMLST型1901を示した。これら7株のMLVA型は、(6-3-3-17-1)を示すものが2株、(4-3-4-17-1)を示すものが3株、(11-3-21-18-1)と(7-3-5-13-1)を示すものがそれぞれ1株ずつ存在した。治療失敗例で分離された株が示す(10/8-3-21-16-1)と最も類似のMLVA型を示す1株(11-3-21-18-1)においても2カ所(下線で示した)、他の株のMLVA型においても[(6-3-3-17-1)、(4-3-4-17-1)、(7-3-5-13-1)]それぞれ3カ所が異なり、遺伝的にはいずれも異なる

ものであることが示された。

D. 考 察

国内ではアジスロマイシン耐性淋菌の分離頻度が他国に比べて高くないことが知られている。また、アジスロマイシン超高度耐性株がアルゼンチン、イギリス、イタリア、米国で分離されているが、国内ではいまだ分離報告はない。

今回の研究で、京都、大阪で分離される淋菌のアジスロマイシン耐性株の分離頻度は3%前後であることが確認された。しかしながら、他国とはことなる剤型である2g除法製剤を用いても治療失敗例が存在することを細菌学的な解析結果に基づいて明確に示すことに成功した。治療失敗例由来株は、現在国内外に広く拡散しているMLST型1901/NG-MAST型1407に属する株であった。このMLST型1901/NG-MAST型1407は、第3世代セファロスポリン（セフェキシム、セフトリアキソン等）に低感受性から耐性を示す株から構成されていると考えられている。実際に2010年4月から2012年3月までに京都、大阪地方で分離された193株中31株はMLST型1901/NG-MAST型1407であったが、その全てはセフトリアキシソンのMICが $0.094\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を示していた（Shimuta et al. 2013 AAC）。しかしながら、治療失敗例由来株はMLST型1901/NG-MAST型1407に属する菌株としてはセフトリアキシソンのMICが著しく低い株であった（ 0.016 あるいは $0.032\mu\text{g}/\text{ml}$ ）。MLVA法によって解析すると、京都、大阪地方で分離されるアジスロマイシン耐性株MLST型1901/NG-MAST型1407は、少なくとも2つ以上のグループに分けられる可能性が示唆さ

れた。

今回の事例ではセフトリアキソンへの感受性が保たれている株によるものであったことから、治療効果判定のための再診の際に速やかにセフトリアキソン投与へ治療方針を変更することができ、その後の再診において完全に治癒されていることが確認出来ている。

また、本研究班の活動の中で、PBP 2 X型をもつMLST7363株が1997年に出現し、それが1998～2005年の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。そのうちのひとつがMLST7363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、MLST

1901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。

アジスロマイシン治療失敗例から分離株を詳細に検討し、2 g 除法製剤を用いてもMIC 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であっても治療失敗につながることを明確に示した。クラミジア感染症との共感染の際の治療法として、アジスロマイシンの治療効果が期待されること、他に治療効果が望める経口剤がないことから、国内においてアジスロマイシンの淋菌感染症治療への利用が高まっていることが想像される。しかしながら、国内外を問わずアジスロマイシンの単剤投与による治療は推奨されていないことから、その利用は限定的である必要がある。少なくとも初診時での菌の分離同定ならびに薬剤感受性試験を実施するとともに、治療効果判定のための再診を行う必要がある。

MLST型1901/NG-MAST型1407株はPBP 2 遺伝子の1塩基置換によりセフトリアキソン耐性になることが実際的な分離菌株(フランスおよびスペイン)で示されている。国内においてはいまだアジスロマイシン耐性株の分離頻度は高くないが、MLST型1901/NG-MAST型1407株が耐性を獲得し始めている事実は、危惧しなければならない状況である。つまり、アジスロマイシン耐性のMLST型1901/NG-MAST型1407株に、フランスおよびスペインで分離されたセフトリアキソン耐性株の変異が導入されることで、米国、イギリス等で導入されているセフトリアキソン/アジスロマイシン2剤併用療法をも無力化する菌株の出現につながる。

一旦出現した耐性淋菌株はしばらくの間消長を繰り返しながらも、いずれ急速に拡散することがCFM-DS/R株の拡散の様子から明らかにされた。現在はアジスロマイシン耐性

とセフトリアキソン低感受性の2つの性状に
関して特に注意を払う必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- (1) Shimuta K, Unemo M, Nakayama S, Morita-Ishihara T, Dorin M, Kawahata T, Ohnishi M. Antibiotic-Resistant Gonorrhea Study Group. 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. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013, 57: 5225-5232.
- (2) Takayama Y, Nakayama S, Shimuta K, Morita-Ishihara T, Ohnishi M. Characterization of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Tokyo in 2005-2011. *J. Infect. Chemother.* 20:339-341. 2014.
- (3) 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. 淋菌の分子タイピングと薬剤感受性. 日本化学療法学会. 長崎, 2012年4月.
- (2) 大西 真. 薬剤耐性淋菌の出現とそのひろがり. 日本性感染症学会, 第25回学術大会. 岐阜, 2012年12月.
- (3) 道林美里・志牟田健・石原朋子・中山周二・保科真二・齋藤良一・大西 真. 咽頭由来 *Neisseria* 属細菌はCRO耐性 *N. gonorrhoeae* H041型の *penA* 遺伝子を保持しているか? 日本細菌学会関東支部会. 東京, 2013年11月.
- (4) 志牟田健・渡辺祐子・黒木俊朗・大西 真. セフィキシム非感受性株の多様性形成について. 日本性感染症学会, 第26回学術大会. 岐阜市, 2013年11月.
- (5) 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.
- (6) 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.
- (7) Makoto Ohnishi. Emergence of ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. 11th 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 ¹	CFM-DS/R2	
		No. ¹	%
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

¹Number of isolates examined genetically is provided in parenthesis.

²MIC 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 ¹	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											

表3 アジスロマイシン投薬前(TF-1, TF-2)および再診時(TF-3, TF-4)に分離された淋菌と他のアジスロマイシン耐性株の薬剤感受性と分子性状解析

Isolate	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)						MLST	NG-MAST	MLVA; Repeat number				
	AZM	CRO	SPT	PCG	CFM	CIP			04-03	04-10	07-02	15-02	16-01
TF-1	4	0.032	8	1	0.032	32	1901	1407	8	3	21	16	1
TF-2	4	0.032	8	1	0.032	32	1901	1407	10	3	21	16	1
TF-3	4	0.016	4	1	0.032	32	1901	1407	8	3	21	16	1
TF-4	4	0.032	8	1	0.064	>32	1901	1407	8	3	21	16	1
00001	1	0.125	8	2	0.25	16	1901	1407	6	3	3	17	1
00002	1	0.125	8	4	0.25	16	1901	1407	6	3	3	17	1
00003	8	0.125	8	1	0.125	>32	1901	1407	11	3	21	18	1
00004	1	0.125	8	4	0.25	>32	10241	1407	4	3	4	17	1
00005	1	0.125	8	2	0.25	>32	1901	1407	4	3	4	17	1
00006	1	0.125	8	1	0.25	>32	1901	1407	4	3	4	17	1
00007	1	0.032	8	0.25	0.125	>32	1901	1407	7	3	5	13	1

図1 1999～2001年分離淋菌株のペニシリンG, セフィキシム、セフトリアキソン感受性プロファイル

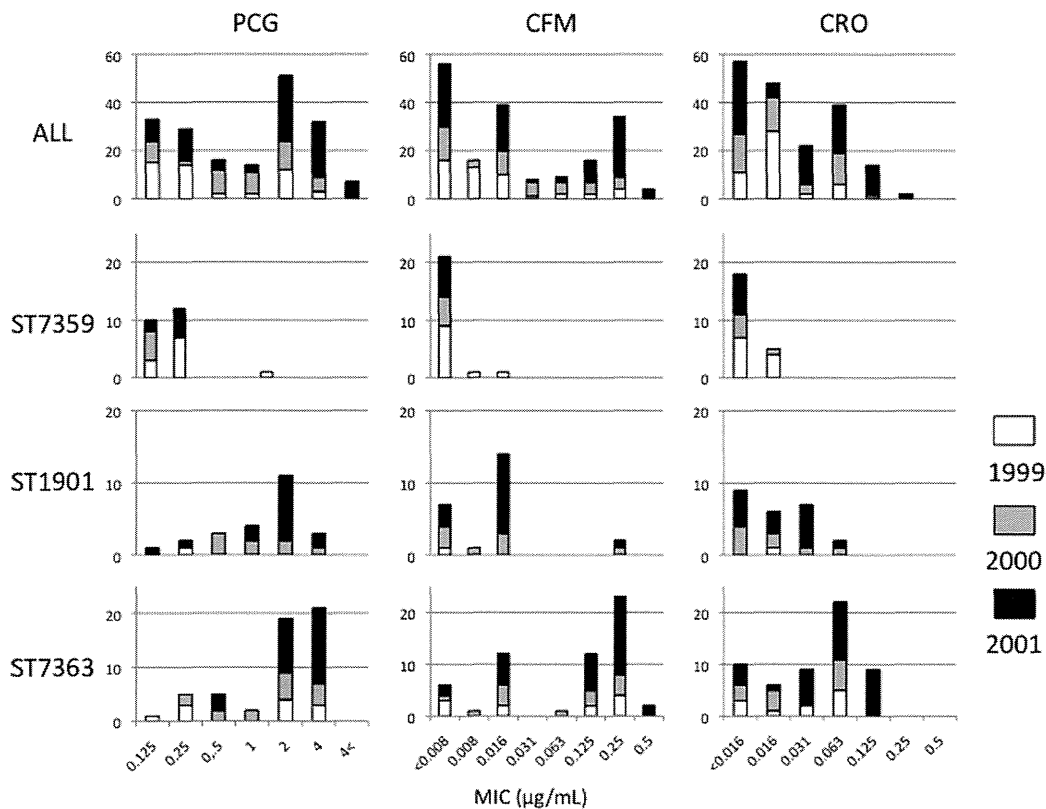
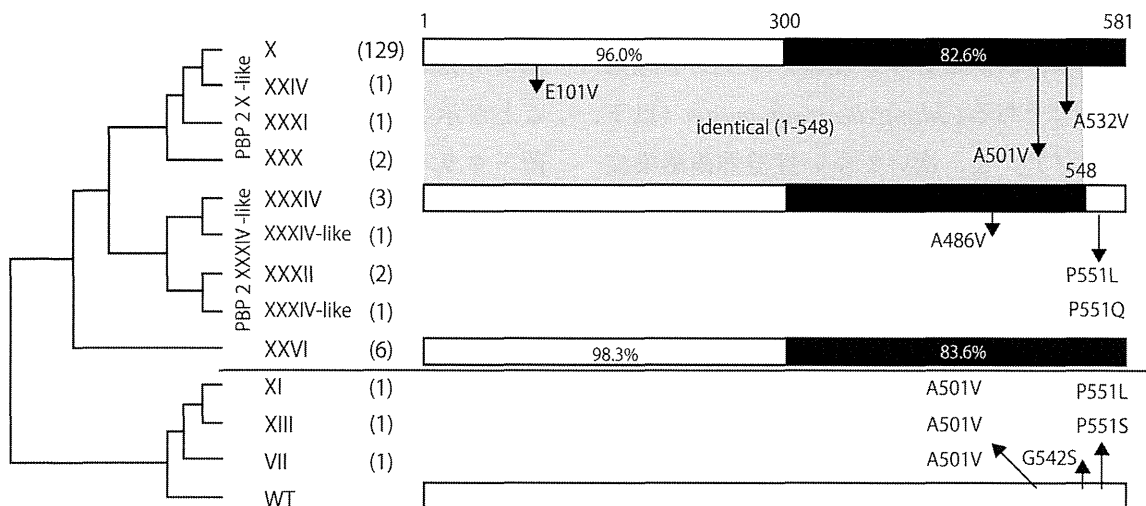


図2 PBP 2 のアミノ酸配列比較 ()内に分離菌株数を示した。



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のうち、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・クラミジア検査を平成24年5月22日～平成27年2月2日の間に実施した。

研究期間の間に、男性190人、女性172人の計362人に検査が実施され、31人の咽頭から淋菌が、10人の咽頭からクラミジアが検出された。このうちの1人は淋菌・クラミジアが同時検出例であった。検体別にみた淋菌・クラミジアの陽性結果は、淋菌の陽性検体数をもっとも多かったのは咽頭スワブで24検体が陽性、次いでうがい液が16検体陽性、上咽頭スワブは13検体が陽性であった。クラミジアの陽性検体数は、咽頭スワブおよび上咽頭スワブが7検体陽性、うがい液が6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動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^{*}、検体③は核酸増幅検査のPCR法[†]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[®] 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 [1g])を2g/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) 2g/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）
- 7) さくら耳鼻咽喉科クリニック（北海道札幌市白石区）
- 8) 西岡じび咽喉科クリニック（北海道札幌市豊平区）
- 9) 天神耳鼻咽喉科（福岡県福岡市中央区）
- 10) よしかわ耳鼻咽喉科（神奈川県川崎市幸区）

5. 研究実施期間

平成24年5月22日～平成27年2月2日

C. 研究結果

1. 対象者の男女別年齢分布（図3）

上記研究期間に検査が実施されたのは362人で、男性190人（年齢分布19～59歳、中央値29.0歳）、女性172人（年齢分布17～57歳、中央値28.0歳）であった。

2. 淋菌・クラミジアの陽性者数（表2）

淋菌陽性者は30人（男性13人・女性7人）で、クラミジア陽性者は9人（男性3人・女性6人）であった。淋菌・クラミジア両方が陽性は1人であった。

3. 検査別にみた淋菌の陽性結果（表3）

淋菌の陽性検体数は上咽頭スワブ13検体、中咽頭スワブ24検体、うがい液16検体であった。このうちすべての検体が陽性であったのは9検体、上咽頭スワブおよび咽頭スワブが陽性であったのは1検体、咽頭スワブおよびうがい液が陽性であったのは4検体、上咽頭スワブのみ陽性が4検体、咽頭スワブのみ陽性が10検体、うがい液のみ陽性が3検体で

あった。

4. 検査別にみたクラミジアの陽性結果（表4）

クラミジアの陽性検体数は上咽頭スワブ7検体、中咽頭スワブ7検体、うがい液6検体であった。このうちすべての検体が陽性であったのは3検体、上咽頭スワブおよび中咽頭スワブが陽性であったのは2検体、中咽頭スワブおよびうがい液が陽性であったのは2検体、上咽頭スワブのみ陽性が2検体、うがい液のみ陽性が1検体であった。

5. 平成25年度の陽性者の受診動機、背景、臨床像検査別にみたクラミジアの陽性結果（表5, 6）

昨年度に報告した平成24年5月22日～平成27年2月18日の間にわれわれが耳鼻咽喉科受診者190人から咽頭の淋菌・クラミジア検査を行った結果では、19人（男性9人、女性10人）から淋菌が検出され、2人（男性1人、女性1人）からクラミジアが検出された。

陽性者22人中12人が自ら咽頭の淋菌・クラミジアの検査を目的に受診していた。

淋菌が検出された男性8人のうち、感染源が特定されたのは男性10人中3人で、それぞれ性風俗従業女性、妻、特定のパートナーであった。淋菌が検出された女性12人のうち、4人が性風俗従業女性であった。性風俗従業女性でない淋菌陽性の女性8人中感染源が特定されたのは3人で、特定のパートナーが2人、夫が1人であった。

咽頭から淋菌・クラミジア両方検出された1人は性風俗従業女性で、口内炎で発症し、その後咽頭炎・扁桃炎・上咽頭炎を続発していた。

咽頭から淋菌が検出された19人の臨床所見は、急性扁桃炎・咽頭炎が4人、急性扁桃炎・上咽頭炎が2人、非特異的咽頭炎が5人、慢性咽喉頭炎が1人、自覚症状も他覚的所見もない無症候性感染が7人、非特異的咽頭炎の5人中1人と無症候性感染の7人中2人に反復性扁桃炎の既往があり、うち2人はその後扁桃摘出術が実施された。

咽頭からクラミジアが検出された2人の臨床所見は、1人が性感染症検査を希望して受診した無症候性感染者であった。もう1人は6歳頃から扁桃炎の反復があり、前医で咽頭からクラミジアが検出された頸部リンパ節炎であった。

D. 考 察

平成26年度に検査を受けた163人の臨床所見の回収と解析はこれから行うが、平成25年度の結果は、平成22年11月18日～平成24年3月6日の間に182人に行った淋菌・クラミジアの咽頭感染の検討結果と同様にクラミジアの咽頭感染者は淋菌よりも少なく、咽頭よりも上咽頭に感染しやすいことが示唆された。

平成25年度の陽性者の臨床像の解析結果は、淋菌の咽頭感染は、無症候性感染だけでなく、反復性扁桃炎、非特異的な咽頭炎の臨床像も呈する場合が少なくないこと、クラミジアは淋菌に比べて咽頭感染を生じることは少なく、感染した場合も咽頭よりも上咽頭に炎症性病変を引き起こしやすい、というこれまで検討した結果と矛盾しないものであった。

今後は、核酸増幅法による咽頭の淋菌・クラミジア検査の検査部位として、また難治性の経過と、陰窩という他の部位にない独特の構造をもつ扁桃との関連性について詳細に検

討する必要があると考える。

E. 結 論

平成24年度から26年度に淋菌およびクラミジアの咽頭検査を行った362人からは、31人の咽頭および上咽頭から淋菌が、10人の咽頭および上咽頭からクラミジアが検出された。うち1人は淋菌とクラミジアが同時に検出された性風俗従業女性であった。淋菌陽性者にもクラミジア陽性者にも反復する扁桃炎の既往がある者が含まれていた。

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 余田敬子：実戦的STI検査 ENT臨床フロンティア 実戦的耳鼻咽喉科検査法 中山書店 東京 2012, pp.181-189.
- (2) 余田敬子：最近のSTIの動向と耳鼻咽喉科開業医における診断上の注意点 ENT臨床フロンティア 実戦的耳鼻咽喉科検査法 中山書店 東京 2012, pp.190-193.
- (3) 余田敬子：特集 性感染症 診断・治療ガイドライン2011を読んで 淋菌の咽頭感染、クラミジアの咽頭感染に関する更新、改訂について 泌尿器外科25：1783

- 1787, 2012.
- (4) 余田敬子：咽頭疾患の診療の進め方
STDとしての咽頭病変 ENT臨床フロンティア 口腔・咽頭疾患、歯牙疾患の臨床 黒野祐一 中山書店 東京 2013, pp.130-141.
- (5) 余田敬子：咽喉頭炎 今日の臨床サポート 森山 寛 エルゼビア・ジャパン株式会社 東京 2013, 電子版.
- (6) 余田敬子：痛みの性状からわかる鼻咽喉科疾患 STDと咽喉頭の痛み ENTONI 153：57-66, 2013.
- (7) 余田敬子：特集 検査結果をどう読むか 細菌・ウイルス検査 HIV関連の検査 JOHNS 29：1429-1433, 2013.
- (8) 余田敬子：こんなときどうする？ 口腔咽喉頭科学・気管食道科学領域 咽頭に多発性のアフタがあり、咽頭痛を訴える！ JOHNS 30：1261-1263, 2014.
- (9) 余田敬子：耳鼻咽喉科とウイルス 口腔・咽頭ヘルペス JOHNS 30：1633-1637, 2014.
- (10) 余田敬子：口腔咽頭の性感染症の診断と治療—耳鼻臨床 107：846-847, 2014.
- (11) 余田敬子：口腔咽頭梅毒—実地臨床における診断と治療のポイント—耳鼻咽喉科展望 57：246-255, 2014.
- (12) 余田敬子：どう使う！ 抗菌薬 性感染症に対する抗菌療法 MB ENT 164：49-57, 2014.
- (13) 余田敬子：口腔・咽頭の性感染症 ENTコンパス ライフ・サイエンス 東京 2014, pp.279-280.
- ## 2. 学会発表
- (1) 余田敬子：難治性に経過したクラミジア性上咽頭炎の一例 第25回日本性感染症学会学術大会 岐阜 2012年12月8日.
- (2) 余田敬子・西田 超：一側性難聴で発症したクラミジア上咽頭炎の一例 第42回日本耳鼻咽喉科感染症研究会 山口 2012年9月7日.
- (3) 余田敬子・杉田麟也・上出洋介 他：耳鼻咽喉科外来における淋菌およびクラミジアトラコマティスの咽頭感染の検討 第113回日本耳鼻咽喉科学会学術大会 新潟 2012年5月11日.
- (4) 余田敬子・西田 超・金子富美恵：当科における淋菌およびクラミジアトラコマティスの咽頭検査実施者 第114回日本耳鼻咽喉科学会学術大会 札幌 2013年5月17日.
- (5) 余田敬子：当科における淋菌およびクラミジアトラコマティスの咽頭検査実施者について 第1回日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会 総会・学術講演会 大分 2013年9月7日.
- (6) 余田敬子・松原茂規：反復性扁桃炎、扁桃周囲膿瘍の既往があり咽頭から淋菌が検出された5症例 第26回日本口腔咽喉科学会学術大会 名古屋 2013年9月13日.
- (7) 余田敬子：当科における淋菌およびクラミジアトラコマティスの咽頭検査実施者の検討 第26回日本性感染症学会学術大会 岐阜 2013年11月17日.
- (8) 余田敬子：ランチョンセミナー 耳鼻咽喉科疾患と性感染症 第115回日本耳鼻咽喉科学会 総会学術講演会 福岡 2014年5月17日.

- (9) 余田敬子：教育セミナー 口腔・咽頭感染症の臨床像と鑑別診断 第28回口腔咽頭科学会 札幌 2014年9月11日.
- (10) 余田敬子：イブニングセミナー 咽頭の淋菌・クラミジア感染症について 第63回日本感染症学会東日本地方会学術集会 第61回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会 東京 2014年10月30日.
- (11) 余田敬子：イブニングセミナー 淋菌およびクラミジアトラコマチスの咽頭感染～診断と治療に関する今後の課題～ 日本性感染症学会第27回学術大会 神戸 2014年12月6日.
- (12) 余田敬子：教育講演 口腔咽頭に関連する性感染症の臨床所見 日本性感染症学会第27回学術大会 神戸 2014年12月7日.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. そのほか

なし

耳鼻咽喉科外来における 咽頭の淋菌・クラミジア検査結果

平成 26年度 総括研究報告
東京女子医科大学 東医療センター 耳鼻咽喉科

余田 敬子

目 的

- 耳鼻咽喉科一般外来受診者における淋菌 およびクラミジアの咽頭感染の状況を明らかにする。
- 耳鼻咽喉科医によって採取されたスワブと、うがい液との検出性を比較する。
- 咽頭から検出された淋菌の薬剤感受性を検討する。
- 咽頭感染の治療レジメの適合性を確認する。