

TABLE 1 Number of tags mapped to HPV16 genome

Cell line	Bar code	No. of tags mapped to HPV16 genome	No. of tags mapped to hg19 genome	Tags per million (TPM)
CaSki-1	GTA	548	9,632,333	56.89
CaSki-2	ACC	664	13,139,414	50.53
CaSki-3	CAC	494	11,535,883	42.79
SiHa-1	AGT	1,504	12,064,850	124.66
SiHa-2	GCG	991	9,050,850	109.49
W12-1	TAC	5,750	15,955,328	350.95
W12-2	GCT	4,019	11,517,132	348.96
W12-3	ATG	3,928	12,018,142	326.84
CIN1	ATG	20,181	9,861,351	2,046.47

2024, nt 12 to 15, nt 1330 to 1322, and nt 741 to 745, some of which were previously identified (26). The TC at nt 90 to 97 (Fig. 2A) corresponds to the p97 promoter, while those at nt 129 to 131 and nt 138 to 144 had probably leaked from the P97 promoter (21). The TC at nt 1125 to 1149, detected only in W12 cells (Fig. 2B), is probably a TSS of E8-E2 (27, 28), and the TC at nt 12 to 15 corresponds to a promoter upstream of p97, indicating limited E1 transcription (Fig. 2D) (27). The TCs at nt 741 to 745 would be a TSS of E1E4, corresponding to the p670 promoter (Fig. 2F) (3). Most interesting, however, was the previously unreported TC at nt 1330 to 1322, which is a potential antisense cluster, highly expressed in W12E cells (Fig. 2E). In addition, we identified another new TC at nt 1217 to 2024 (Fig. 2C).

To verify these novel transcripts, W12 RNA with or without poly(A) was reverse transcribed using a ReverTra Ace qPCR RT kit (Toyobo), and 3' rapid amplification of cDNA ends (3' RACE)

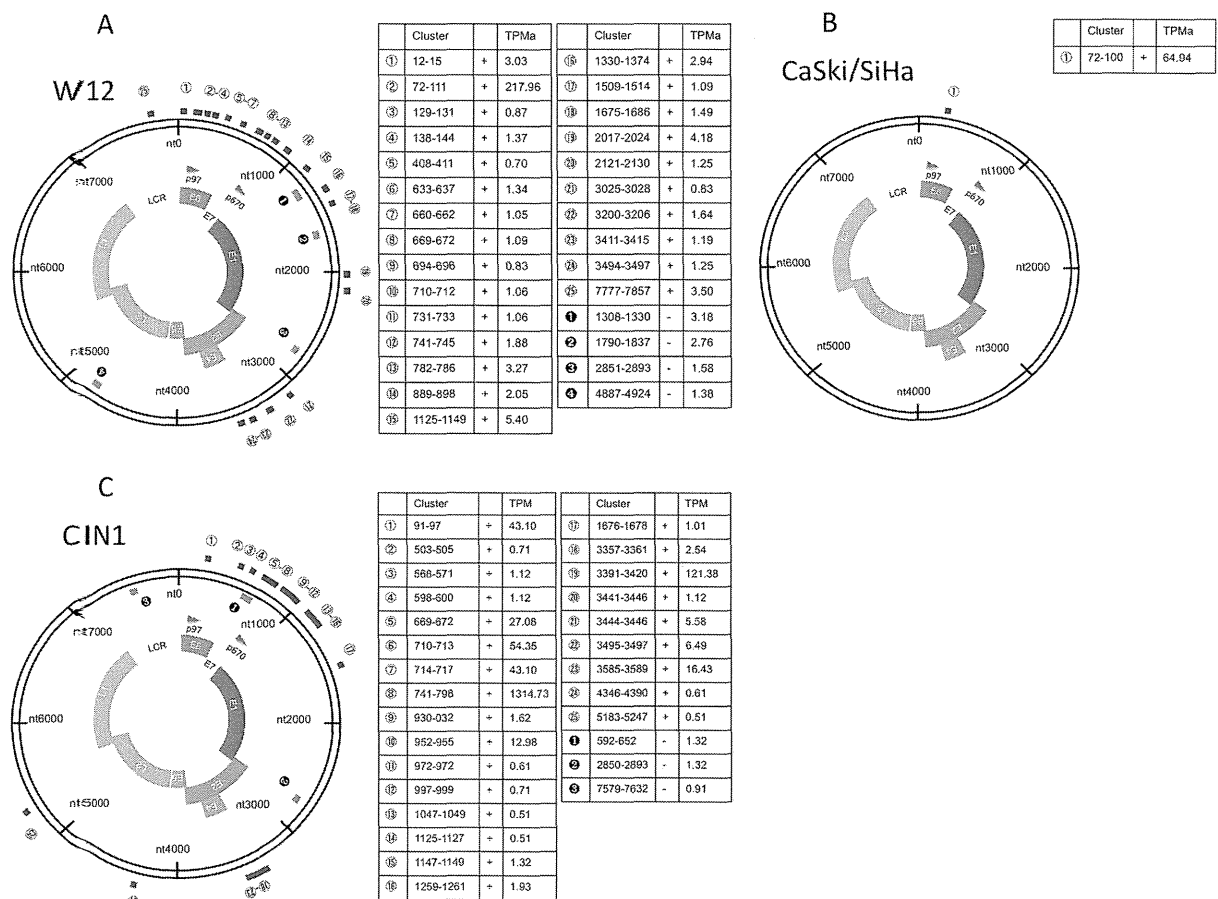


FIG 1 Clustered TSSs of the HPV16 genomes of cervical cell lines of different grades. CAGE tags of HPV16 genes from each cell lines are quantitatively visualized. The data are representative of the results determined with the respective cell lines. The CaSki and SiHa cultured cells, representing a transcriptional program characteristic of the conditions in a tumor, were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin. W12E (20863) is an HPV16-positive cell line derived from a CIN1 lesion (23). W12E (20863) cells were cocultured with mitomycin C-treated 3T3 fibroblast feeder cells. (A) Circular map depicting viral transcripts identified by Paraclu clustering. CAGE tags were clustered for HPV16 genes from W12E cells. Regions containing over 0.5 tags per million (TPM) in all samples were selected as tag clusters (TCs) and mapped to the circular HPV16 genome. (B) We defined regions containing over 0.5 TPM in the sample as TCs. Then, CAGE tags were clustered for HPV16 genes from the CaSki and SiHa cells. (C) CAGE tags were clustered for HPV16 genes from a CIN1 clinical sample. Notably, we found 25 positive-strand TCs and 4 negative-strand TCs in W12E cells (A), whereas only 1 positive-strand TC was found in CaSki or SiHa cells (B). TPMs, the average number of TPMs.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on February 11, 2015 by UNIV OF TOKYO

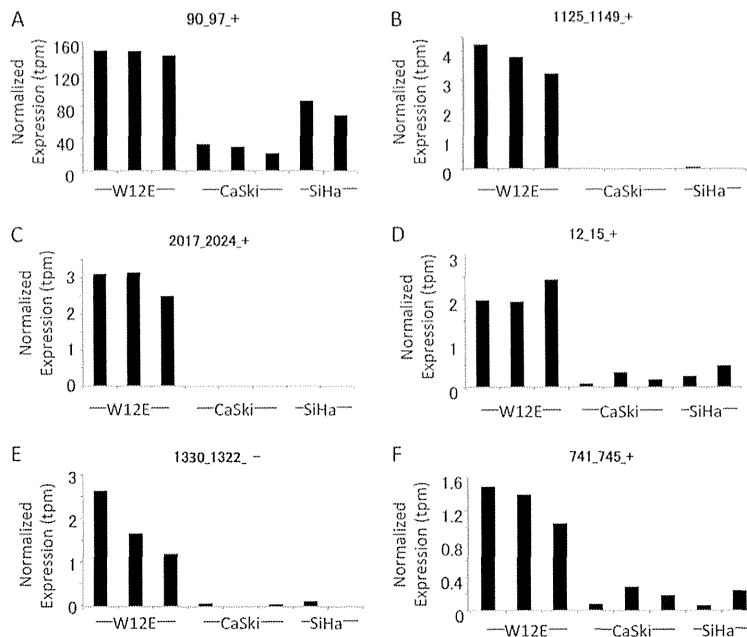


FIG 2 Expression levels of the top 6 tag clusters (TCs) in W12E, CaSki, and SiHa cells. The top 6 expressed TCs were selected, and expression levels are indicated as tags per million (TPM) (25). Six TSS clusters were frequently found to be prominent in W12E cells, originating from nt 90 to 97 (90_97_+), nt 1125 to 1149 (1125_1149_+), nt 2017 to 2024 (2017_2024_+), nt 12 to 15 (12_15_+), nt 1322 to 1330 (1330_1322_-), and nt 741 to 745 (741_745_+).

was carried out using *Ex Taq* (TaKaRa) on the detected clusters found in clustering analysis of HPV16 genome expression, using the nt-97 cluster as a positive control.

To verify RNA without poly(A), a 3' preadenylated DNA adap-

tor sequence was ligated at the 3' end of RNA. To increase specificity, we carried out first RACE and second RACE experiments. Primer pairs for each peak [oligo(dT)] adaptor are shown in Fig. 3. The PCR conditions for the first RACE and second RACE exper-

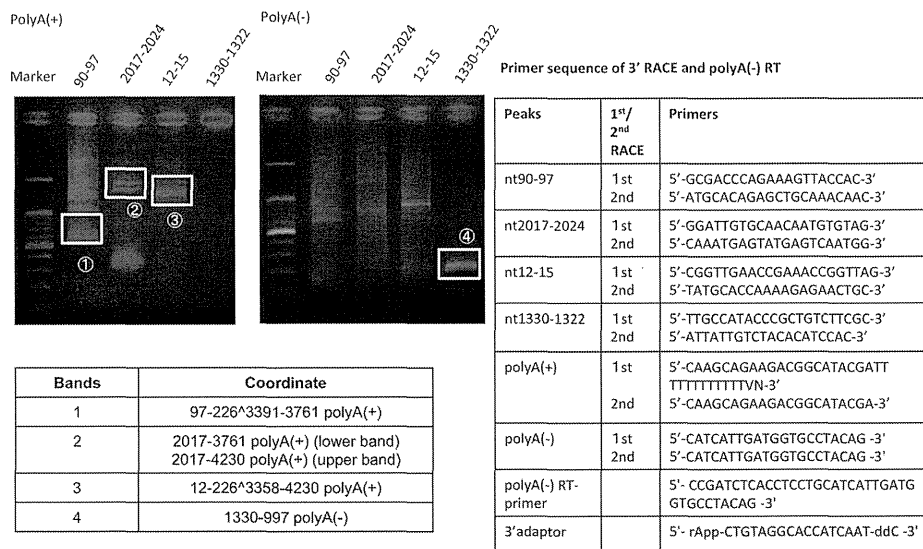


FIG 3 Validation of novel transcripts from 3' RACE analysis. Agarose gel electrophoresis of transcripts from W12 cell eluted RNA. The results of the experiment indicate that the transcript originating at nt 1330 to 1322 could correspond to a newly identified viral antisense noncoding RNA without poly(A). Further, we could encode a newly identified transcript of nt 2017 to 2024 starting in the middle of E1 coding gene. ddC, dideoxycytosine; rApp, adenylation-5'; RT, reverse transcriptase.

iments were as follows: for the first RACE experiment, 35 cycles at 94°C for 30 s, 57°C for 30 s, and 72°C for 30 s; for second RACE experiment, 35 cycles at 94°C for 30 s, 57°C for 30 s, and 72°C for 30 s. The results are shown in Fig. 3. PCR products were extracted (Qiagen) and sequenced by Applied Biosystems 3130xl (Fasmac). Importantly, we identified, for the first time, the full coordinates of a novel antisense transcript starting from nt 1330 as a noncoding RNA (ncRNA) without poly(A) and also a novel transcript, nt 2017 to 2024, starting in the middle of the E1 gene. Although most viral RNAs are considered to be polyadenylated at the 3' end, our finding confirms that the noncoding viral RNA starting from nt 1330 lacks poly(A) signals.

In this study, we performed CAGE analysis and investigated TSSs from the perspective of both the HPV16 and human genomes, using cell lines containing episomal and integrated HPV sequences. All the TSSs used in the HPV16 transcriptome, in the HPV16-containing cervical keratinocyte W12E cell line, and in the cervical cancer-derived SiHa and CaSki cell lines were investigated. Intriguingly, we also show that a diversity of viral transcripts, seen in W12E cells, shared some identity with the CIN1 biopsy specimen subjected to a precise colposcopic examination. Recently, as shown previously in the mammalian transcriptome (29), abundant virally encoded noncoding RNAs (ncRNAs) were identified (30), but this is the first full confirmation of a preliminary observation of antisense transcripts in HPV.

Using the CAGE method, we have successfully established unbiased analyses of reproducible transcriptional start sites across the HPV16 genome, potentially identifying novel transcripts, including ncRNAs, for future RNA therapies (31). Further comprehensive studies will aim to identify possible markers to predict the outcome of infections with HPV.

Nucleotide sequence accession number. The sequence data reported are available in the DDBJ BioProject under the accession number PRJDB3385.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Ri-ichiroh Manabe and Michihira Tagami (Division of Genomic Technologies, RIKEN) for the excellent advice and technical guidance on the preparation of CAGE analysis. All sequencing was performed by the Genome Analysis Support Facility (Division of Genomic Technologies, RIKEN). We are also very grateful to Paul Lambert (University of Wisconsin School of Medicine and Public Health, Madison, Wisconsin) for his kind gift of W12E (20863) cell lines.

This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (K.N., K.K.) from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan.

REFERENCES

- Arbyn M, Castellsagué X, de Sanjosé S, Bruni L, Saraiya M, Bray F, Ferlay J. 2011. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol* 22:2675–2686. <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdr015>.
- zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342–350. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc798>.
- Doornbar J, Parton A, Hartley K, Banks L, Crook T, Stanley M, Crawford L. 1990. Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology* 178:254–262.
- Grassmann K, Rapp B, Maschek H, Petry KU. 1996. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J Virol* 70:2339–2349.
- Braunstein TH, Madsen BS, Gavnholt B, Rosenstjerne MW, Johnsen CK, Norrild B. 1999. Identification of a new promoter in the early region of the human papillomavirus type 16 genome. *J Gen Virol* 80(Pt 12):3241–3250.
- Rosenstjerne MW, Vinther J, Hansen CN, Prydsøe M, Norrild B. 2003. Identification and characterization of a cluster of transcription start sites located in the E6 ORF of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* 84:2909–2920. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.19332-0>.
- Zheng Z, Tao M, Yamanegi K, Bodaghi S, Xiao W. 2004. Splicing of a cap-proximal human papillomavirus 16 E6E7 intron promotes E7 expression, but can be restrained by distance of the intron from its RNA. *J Mol Biol* 337:1091–1108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.023>.
- Schmitt M, Pawlita M. 2011. The HPV transcriptome in HPV16 positive cell lines. *Mol Cell Probes* 25:108–113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2011.03.003>.
- Schmitt M, Dalstein V, Waterboer T, Clavel C, Gissmann L, Pawlita M. 2011. The HPV16 transcriptome in cervical lesions of different grades. *Mol Cell Probes* 25:260–265. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2011.05.003>.
- Schwartz S. 2013. Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. *Virology* 445:187–196. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.034>.
- Milligan SG, Veerapraditsin T, Ahamet B, Mole S, Graham SV. 2007. Analysis of novel human papillomavirus type 16 late mRNAs in differentiated W12 cervical epithelial cells. *Virology* 360:172–181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2006.10.012>.
- Shiraki T, Kondo S, Katayama S, Waki K, Kasukawa T, Kawaji H, Kodzius R, Watahiki A, Nakamura M, Arakawa T, Fukuda S, Sasaki D, Podhajska A, Harbers M, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y. 2003. Cap analysis gene expression for high-throughput analysis of transcriptional starting point and identification of promoter usage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15776–15781. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2136655100>.
- Kodzius R, Kojima M, Nishiyori H, Nakamura M, Fukuda S, Tagami M, Sasaki D, Imamura K, Kai C, Harbers M, Hayashizaki Y, Carninci P. 2006. CAGE: cap analysis of gene expression. *Nat Methods* 3:211–222. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth0306-211>.
- Plessy C, Bertin N, Takahashi H, Simone R, Salimullah M, Lassmann T, Vitezic M, Severin J, Olivarius S, Lazarevic D, Hornig N, Orlando V, Bell I, Gao H, Dumais J, Kapranov P, Wang H, Davis CA, Gingeras TR, Kawai J, Daub CO, Hayashizaki Y, Gustincich S, Carninci P. 2010. Linking promoters to functional transcripts in small samples with nano-CAGE and CAGEscan. *Nat Methods* 7:528–534. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.586>.
- Kanamori-Katayama M, Itoh M, Kawaji H, Lassmann T, Katayama S, Kojima M, Bertin N, Kaiho A, Ninomiya N, Daub CO, Carninci P, Forrest AR, Hayashizaki Y. 2011. Unamplified cap analysis of gene expression on a single-molecule sequencer. *Genome Res* 21:1150–1159. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.115469.110>.
- Takahashi H, Lassmann T, Murata M, Carninci P. 2012. 5' end-centered expression profiling using cap-analysis gene expression and next-generation sequencing. *Nat Protoc* 7:542–561. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2012.005>.
- Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, Oyama R, Ravasi T, Lenhard B, Wells C, Kodzius R, Shimokawa K, Bajic VB, Brenner SE, Batalov S, Forrest AR, Zavolan M, Davis MJ, Wilming LG, Aidinis V, Allen JE, Ambesi-Impiombato A, Apweiler R, Aturaliya RN, Bailey TL, Bansal M, Baxter L, Beisel KW, Bersano T, Bono H, Chalk AM, Chiu KP, Choudhary V, Christoffels A, Clutterbuck DR, Crowe ML, Dalla E, Dalrymple BP, de Bono B, Della Gatta G, di Bernardo D, Down T, Engstrom P, Fagiolini M, Faulkner G, Fletcher CF, Fukushima T, Furuno M, Futaki S, et al. 2005. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309:1559–1563. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1112014>.
- Frith MC, Valen E, Krogh A, Hayashizaki Y, Carninci P, Sandelin A. 2008. A code for transcription initiation in mammalian genomes. *Genome Res* 18:1–12. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.6831208>.
- Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, Tanzer A, Lagarde J, Lin W, Schlesinger F, Xue C, Marinov GK, Khatun J, Williams BA, Zaleski C, Rozowsky J, Röder M, Kococinski F, Abdelhamid RF, Alioto T, Antoshechkin I, Baer MT, Bar NS, Batut P, Bell K, Bell I, Chakraborty S, Chen X, Chrast J, Curado J, Derrien T, Drenkow J, Dumais E, Dumais J, Duttgupta R, Falconnet E, Fastuca M, Fejes-Toth K, Ferreira P, Foissac S, Fullwood MJ, Gao H, Gonzalez D, Gordon A, Gunawardena H, Howald C, Jha S, Johnson R, Kapranov P,

- King B, et al. 2012. Landscape of transcription in human cells. *Nature* 489:101–108.
20. FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (DGT), Forrest AR, Kawaji H, Rehli M, Baillie JK, de Hoon MJ, Lassmann T, Itoh M, Summers KM, Suzuki H, Daub CO, Kawai J, Heutink P, Hide W, Freeman TC, Lenhard B, Bajic VB, Taylor MS, Makeev VJ, Sandelin A, Hume DA, Carninci P, Hayashizaki Y. 2014. A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature* 507:462–470. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13182>.
 21. Smotkin D, Wettstein F. 1986. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4680–4684. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.83.13.4680>.
 22. Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, Schlegel R, Howley PM. 1985. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 119:361–366.
 23. Stanley MA, Browne HM, Minson AC. 1989. Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line. *Int J Cancer* 43:672–676.
 24. Li H, Durbin R. 2010. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 26:589–595. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698>.
 25. Valen E, Pascarella G, Chalk A, Maeda N, Kojima M, Kawazu C, Murata M, Nishiyori H, Lazarevic D, Motti D, Marstrand TT, Tang MH, Zhao X, Krogh A, Winther O, Arakawa T, Kawai J, Wells C, Daub C, Harbers M, Hayashizaki Y, Gustincich S, Sandelin A, Carninci P. 2009. Genome-wide detection and analysis of hippocampus core promoters using DeepCAGE. *Genome Res* 19:255–265. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.084541.108>.
 26. Graham SV. 2010. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiol* 5:1493–1506. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.10.107>.
 27. Lacey MJ, Anson JR, Turek LP, Haugen TH. 2008. Functional mapping of the human papillomavirus type 16 E1 cistron. *J Virol* 82:10724–10734. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00921-08>.
 28. Lacey MJ, Anson JR, Thomas GS, Turek LP, Haugen TH. 2008. The E8 E2 gene product of human papillomavirus type 16 represses early transcription and replication but is dispensable for viral plasmid persistence in keratinocytes. *J Virol* 82:10841–10853. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01481-08>.
 29. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, Guernec G, Martin D, Merkel A, Knowles DG, Lagarde J, Veeravalli L, Ruan X, Ruan Y, Lassmann T, Carninci P, Brown JB, Lipovich L, Gonzalez JM, Thomas M, Davis CA, Shiekhhattar R, Gingeras TR, Hubbard TJ, Notredame C, Harrow J, Guigó R. 2012. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res* 22:1775–1789. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.132159.111>.
 30. Sullivan CS. 2008. New roles for large and small viral RNAs in evading host defences. *Nat Rev Genet* 9:503–507. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2349>.
 31. Takahashi H, Carninci P. 1 September 2014, posting date. Widespread genome transcription: new possibilities for RNA therapies. *Biochem Biophys Res Commun* <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.139>.

4. 性感染症—尿道炎への対応—

Management for urethritis in sexually transmitted infections

高橋 聡

Keywords 淋菌, クラミジア・トラコマティス, 尿道炎

はじめに

男性の性感染症として最も罹患率が高いものは尿道炎である。尿道炎は、原因となる病原体により淋菌性尿道炎と非淋菌性尿道炎に分類される。これは、過去には、非淋菌性尿道炎の主要な原因微生物であるクラミジア・トラコマティスが検出できなかったためである。現在では、クラミジア・トラコマティスは検出が可能であることから、さらに細かく分類されることもあるが(表1)、治療法から分類すると、この淋菌性と非淋菌性に分けることは適切である。

淋菌性尿道炎は、抗菌薬による治療が行われる以前には、難治性疾患であり、完治が難しいとも考えられていた。適切な治療法がないことは、尿道狭窄という合併症を引き起こし、腎後性腎不全へと進行した症例もあった。しかし現在では、淋菌の多剤耐性化が進んではいるものの有効な抗菌薬があることから、そのような重篤な例はみない。

生命への関わりがない感染症と軽視されていた性感染症であるが、男性の尿道炎と対比される女性の子宮頸管炎では、その進行により不妊症、早産、流産などの原因となり得ることから、ある意味、生命に関わる重要な感染症であるという認識をすべきである。性感染症は、公衆衛生学的にきわめて重要な感染症であるといえる。

表1 尿道炎の分類

淋菌の有無による分類	淋菌性尿道炎
	非淋菌性尿道炎
検出可能な病原体による分類	淋菌性尿道炎
	(淋菌性クラミジア性尿道炎)
	(非淋菌性)クラミジア性尿道炎
	非淋菌性非クラミジア性尿道炎

* 淋菌性クラミジア性尿道炎は、臨床的には淋菌性尿道炎と診断する。クラミジア・トラコマティス検出の検査結果が、後に判明することと、淋菌性尿道炎の症状が主要であることから、クラミジア・トラコマティスが合併したものとする。

I. 病 態

男性の尿道炎は、原因微生物である淋菌、クラミジア・トラコマティス、マイコプラズマ・ジェニタリウムなどが性交により外尿道口から侵入し尿道に感染し発症する。これにより、淋菌では強い排尿時痛、外尿道口からの混濁した膿の排出など症状を発現する。クラミジア・トラコマティスとマイコプラズマ・ジェニタリウムも症状を有するが、淋菌と比較すると軽度である。また、クラミジア・トラコマティスでは、無症候性感染があり得る。

II. 診断と診断のための検査

前述した尿道炎の原因となり得る微生物は、通

表2 クラミジア・トラコマティス検出法としての核酸増幅法を用いた検出キット

測定原理	検出キット	増幅標的
PCR (polymerase chain reaction) 法	Amplicor CT/NG Assay	cryptic plasmid DNA
TMA (transcription-mediated amplification) 法	APTIMA Combo 2 Assay	ribosomal RNA
SDA (strand displacement amplification) 法	BD ProbeTec ET	cryptic plasmid DNA

常は尿道には存在しないことから、これらの検出が診断には重要である。淋菌では膿尿を認めるが、クラミジア・トラコマティスでは膿尿を認めない場合もある。

淋菌を検出する方法は、グラム染色鏡検、培養、核酸増幅法の3つである。グラム染色鏡検は、迅速診断法としても有用である。培養は、結果が出るまでに時間がかかるが、抗菌薬感受性試験を行うことができることから、必須の検査である。現状では、淋菌は多剤耐性化の傾向が著しく、抗菌薬感受性を知ることが適切な治療を行ううえでも重要である。核酸増幅法は、遺伝子検出法であり高感度で特異度が高い。これも、有用な検査法ではあるが、抗菌薬感受性試験を行うことができないという欠点がある。

クラミジア・トラコマティスの検出法は、蛍光抗体による鏡検、培養、抗原検出、核酸増幅法があげられる。ただ、鏡検と培養は煩雑で、かつ、手技には熟練が必要であり、臨床的には応用が難しい。抗原検出は、比較的短時間で結果が得られることから迅速検査として有用ではあるが、核酸増幅法と比較すると感度が劣る。現在のクラミジア・トラコマティス検出の標準法は、核酸増幅法である。核酸増幅法を用いた検出キットは3種類あり(表2)、いずれもクラミジア性尿道炎の診断において有用であると評価されている¹⁾。

Ⅲ. 治療

淋菌の治療は、大きく変遷してきている。過去には、ペニシリン系やニューキノロン系抗菌薬が有効であったが、現在ではこれらは著しく耐性化しており、治療薬として用いることはできなくなっている。現在の淋菌感染症治療薬は、すべて

表3 淋菌性尿道炎に対する推奨治療 (文献2)より引用, 改変)

抗菌薬	投与量	投与日数	投与経路
セフトリアキソン	1 g	1回	静注
セフォジジム	1 g	1回	静注
スペクチノマイシン	2 g	1回	筋注

注射用抗菌薬が推奨されている(表3)²⁾。また、近年、口腔性交による咽頭淋菌感染と咽頭クラミジア感染が問題となっているが、咽頭淋菌に対して単回投与で有効なのはセフトリアキソンのみである。

クラミジア・トラコマティスに対する治療は、マクロライド系、テトラサイクリン系、ニューキノロン系抗菌薬の一部が有効である(表4)³⁾。クラミジア・トラコマティスには、安定した耐性菌は存在しないことから、非淋菌性尿道炎の主要な原因微生物であるクラミジア・トラコマティスに対する治療は確立されている。ただ前述したように、臨床的には非淋菌性尿道炎に対する治療が行われるわけであるが、マイコプラズマ・ジェニタリウムでは、レボフロキサシンなどのニューキノロン系抗菌薬が有効ではない。ただし、新しい世代のニューキノロン系抗菌薬であるシタフロキサシンは有効である。また、アジスロマイシンに対する耐性株の報告も海外では散見されることから、治療確認は必要である。

なお、クラミジア・トラコマティスが検出されない非淋菌性非クラミジア性尿道炎では、ニューキノロン系抗菌薬が有効でない場合には、アジスロマイシンに変更するか、新しい世代のニューキノロン系抗菌薬であるシタフロキサシンに変更す

表 4 クラミジア性尿道炎に対する推奨治療 (文献3) より引用, 改変)

抗菌薬	投与量	投与日数	投与経路
アジスロマイシン	1g もしくは 2g	1回	経口
クラリスロマイシン	1回 200 mg, 1日 2回	7日間	経口
ミノサイクリン	1回 100 mg, 1日 2回	7日間	経口
トスフロキサシン	1回 150 mg, 1日 2回	7日間	経口
レボフロキサシン	1回 500 mg, 1日 1回	7日間	経口

るのも一つの有効な対応である。

IV. 処方例

淋菌性尿道炎では、咽頭にも淋菌が感染している可能性があることから、セフトリアキソン 1g を静注し、後日、クラミジア・トラコマティスが検出されるかどうかの確認のために再診とする。クラミジア・トラコマティスが陽性であれば、アジスロマイシン 2g を処方し、クラミジア・トラコマティスが陰性であれば症状の消失を確認して受診を終了とする。

クラミジア性尿道炎に対しては、アジスロマイシン 2g を処方する。もちろん、淋菌が検出されない非淋菌性尿道炎に対してであり、1~2週間後に治癒確認のために再診とする。アジスロマイシン 2g は、下痢の副作用があるので、患者には十分にその可能性を伝え、場合によってはトリメブチン・マレイン酸塩を同時に処方する。トリメブチン・マレイン酸塩の併用は、下痢の発現を抑え

る効果が報告されている。アジスロマイシンが投与できない場合には、レボフロキサシン (1回 500 mg を 1日 1回, 7日間) が有効である。再診時に、クラミジア・トラコマティスが陰性で症状や膿尿の持続がみられるようであれば、シタフロキサシン (1回 100 mg で 1日 2回, 7日間) を処方し、再度治癒確認を行う。

治療中は、性交はしない、もしくはコンドームを必ず着用するように伝える。治癒が確認できていない時期の性交は、再発の原因となる。

文献

- 1) Cook RL, Hutchison SL, Ostergaard L, et al : Systematic review : noninvasive testing for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. Ann Intern Med 142 : 914-925, 2005
- 2) 淋菌感染症, 性感染症 診断・治療 ガイドライン 2011. 日性感染症会誌 22 : 52-59, 2011
- 3) 性器クラミジア感染症, 性感染症 診断・治療 ガイドライン 2011. 日性感染症会誌 22 : 60-64, 2011

性感染症における診断キットの有用性と限界

たかはし さとし
高橋 聡*

要旨 性感染症の原因微生物として、クラミジア・トラコマティスと淋菌が代表的であり、もっとも高感度で高特異度である核酸増幅法を用いた診断キットが活用されている。診断キットの評価法が特殊であること、培養法と異なり菌株を得ることができないこと、治癒判定が治療直後にはできないこと、阻害物質による偽陰性の可能性があること、というような問題もあるが、いずれも核酸増幅法の特長であり、これらを十分に理解したうえで、この優れた診断キットを活用することが望ましい。

はじめに

性感染症診断にあたって、診断キットは、臨床の場に欠かすことができない。診断キットの確立により診断が容易となり、手技などに影響されず正確に診断できるようになった。日本では性感染症でもっとも頻度が高いのは性器クラミジア感染症と淋菌感染症であるが、これらの原因微生物であるクラミジア・トラコマティスと淋菌に関しては、とくに、診断キットが発達してきた。この診断キットの発達が、より多くの臨床研究を可能にし、疾患に対する理解も深めた。しかし、尿道炎の原因微生物の一つであるマイコプラズマ・ジェニタリウムでは、健康保険適用の診断キットがないため、臨床研究にはさまざまな制約がある。また、ヒトパピローマウイルスを原因微生物とする尖圭コンジローマの診断もいまだに視診による。そのため、経験が少なかったり非典型的な疣贅では診断を誤る場合も少なからずあり得る。このように、診断キットが臨床に用いられていることは、正確

な診断を行ううえで重要であるが、その特徴を知ることが診断キットを適切に使いこなすためにも重要である。本稿では、クラミジア・トラコマティスと淋菌の診断キットについて、特徴と限界について解説する。

I 性器クラミジア感染症の特徴

クラミジア・トラコマティスが原因微生物となる性感染症は、男性では尿道炎、女性では子宮頸管炎が代表的である。クラミジア性子宮頸管炎は女性の性感染症ではもっとも頻度が高い。罹患年齢は、性的活動性の高い年代が感染しやすいことから女性では10歳代後半から20歳代がピークであり、男性では5~10歳程度高めとなる。重要なことは、性交開始の低年齢化により、クラミジア性子宮頸管炎の罹患年齢も低年齢化していることである¹⁾(表1)。この現状を考慮し、10歳代の若年者に性感染症を知ってもらうためには、自分を守らない性交(unprotected sexual intercourse)を行わないような指導(教育)が必要となっていることはいままでもない。

*札幌医科大学医学部泌尿器科
〒060-8543 北海道札幌市中央区南1条西16丁目

表1 性器クラミジア感染症の罹患率 (10万人・年対罹患率)

年齢 (歳)	10~14	15~19	20~24	25~29	30~34	35~39
男性	0	237.8	463.2	475.5	369.7	266.2
女性	21.4	967.6	1,183.1	876.7	505.8	234.0

(熊本悦明, 2004¹⁾より改変)

表2 性器クラミジア感染症の推奨治療薬

薬剤名	商品名
アジスロマイシン クラリスロマイシン	ジスロマック クラリス, または, クラリシッド
ミノサイクリン ドキシサイクリン レボフロキサシン トスフロキサシン	ミノマイシン ビブラマイシン クラビット オゼックス, または, トスキサシン

(性器クラミジア感染症, 性感染症 診断・治療ガイドライン 2011²⁾より改変)

クラミジア性尿道炎の症状は、軽度の排尿痛、漿液性で比較的少量の尿道分泌物、尿道掻痒感、尿道不快感などである。クラミジア性子宮頸管炎の症状は、帯下増量感、不正出血、下腹部痛、性交痛などである。ただ、前述したように、性器クラミジア感染症の特徴は、無症候性感染である。女性では、クラミジア性子宮頸管炎の半数以上は無症候性であるとの報告もある²⁾。また、無症候性若年健康男性でも4~5%程度で尿からクラミジア・トラコマティスが検出される³⁾。この無症候性感染は、一般的に、医療機関を受診する契機となる、いわゆる主訴がないことから、結果として感染源のままの状態が続く危険性がある。また、無症候性感染から、女性では骨盤腹膜炎や骨盤内炎症性疾患 (pelvic inflammatory disease : PID)、男性では急性精巣上体炎などの重症感染症へと進行する可能性がある。そして、医療機関を受診しないということは、無症候性感染のまま診断されることがなく、治療の機会を得られないことから、結果として性感染症のコントロールができないとい

うことになる。また、後述する淋菌感染症と同様に口腔性交による咽頭感染があり、感染源として問題となる。

治療は、マクロライド系、テトラサイクリン系、ニューキノロン系抗菌薬の一部が有効である (表2)。ニューキノロン系抗菌薬としては、シタフロキサシンも有効である。

II 淋菌感染症の特徴

淋菌が原因微生物となる性感染症は、クラミジア・トラコマティスと同様に男性では尿道炎、女性では子宮頸管炎である。淋菌性尿道炎は男性の性感染症ではもっとも頻度が高い⁴⁾。

淋菌性尿道炎の症状は、クラミジア性尿道炎よりも強い排尿痛、量が多く混濁した尿道分泌物、亀頭部の発赤などである。女性では、帯下の増量や不正出血が一般的ではあるが、症状がはっきりしない場合も多い。淋菌性尿道炎では、クラミジア性尿道炎と異なり無症候性感染はほとんどない。

現在の淋菌感染症の問題点の一つは、口腔性交による咽頭感染である⁵⁾。クラミジア・トラコマティスと同様であるが、淋菌の咽頭感染でも特異的な症状を認めない。したがって、感染症として積極的に検査を行うことなく、感染源として経過する可能性がある。ナイセリア属は、口腔内や咽頭に存在している場合があり、淋菌も咽頭へ容易に感染するのではないかと推測されている。

淋菌感染症のもう一つの問題は、抗菌薬耐性化である。淋菌は、ペニシリン系抗菌薬の耐性化から始まり、テトラサイクリン系抗菌薬、そ

して、ニューキノロン系抗菌薬にも耐性化した⁶⁾。さらに、経口セフェム系抗菌薬として推奨治療薬であったセフィキシムに対しても低感受性株が出現し、経口抗菌薬では治療が難しくなった。現状では、淋菌感染症に対する推奨抗菌薬は3種類のみである(表3)。最近の報告では、京都からもっとも有効な治療薬とされるセフトリアキソン低感受性株が分離され、世界中で話題となっている⁷⁾。

III 核酸増幅法を用いた診断キット

淋菌感染症の迅速診断としては、尿道炎であれば尿道分泌物を検体としてグラム染色鏡検法で、多核白血球に貪食された双球菌の形状を示すグラム陰性球菌を観察することが簡便、かつもっとも迅速である。そして、抗菌薬感受性試験を行うことができることから、培養法も推奨される⁴⁾。しかし、子宮頸管検体では鏡検法による診断は困難ではあるが、培養法は推奨される。クラミジア・トラコマティスに関しては、培養法は専用のキャビネットを必要とし、手技が煩雑で臨床現場では診断法として有用ではない。したがって、さまざまな条件にも左右されない高感度の診断キットは、臨床現場に必須で

あるといえる。

現状では、高感度、かつ高特異度である核酸増幅法がもっとも信頼のおける診断法といえる。しかし、少ないものの問題点もある。これらをキットごとで全般的に解説する。現状では、polymerase chain reaction (PCR) 法、strand displacement amplification (SDA) 法、transcription mediated amplification (TMA) 法を、それぞれ用いた診断キットが臨床現場で使用可能である(表4)。これらの診断キットは、クラミジア性尿道炎の診断に関して、同等の感度と特異度であるとのレビューが示されている⁸⁾。

IV PCR法を用いた診断キット

現状では国内でもっとも普及している診断キットがPCR法を用いたキットである。クラミジア・トラコマティスの増幅標的は cryptic plasmid の一部である。この cryptic plasmid は、機能が明らかになっていない環状DNAで、一つの基本小体粒子に10個ほど存在する。つまり、クラミジア・トラコマティスの単位を基本小体と考えると、理論的には感度が10倍になる。同様に、淋菌ではDNA(シトシンメチルトランスフェラーゼ遺伝子の一部)が増幅標的である。

PCR法を用いたキットの利点は、PCR法が国内で広く普及しており、きわめて慣れ親しんだ方法であり、多くの臨床研究が行われてきたことであろう。

次に、PCR法を用いたキットの問題点を挙げる。クラミジア・トラコマティスについては、

表3 淋菌感染症の推奨治療薬

薬剤名	商品名
セフトリアキソン	ロセフィン
セフォジジム	ケニセフ
スペクチノマイシン	トロピシン

(淋菌感染症、性感染症 診断・治療ガイドライン 2011⁹⁾より改変)

表4 クラミジア・トラコマティスと淋菌の核酸増幅法を用いた診断キット

製品名	核酸増幅法の原理	増幅標的
アンプリコア STD-1 クラミジアトラコマチス ナイセリアゴノレア	PCR法	DNA
BD プローブテック クラミジア・トラコマチス ナイセリア・ゴノレア	SDA法	DNA
アプティマ Combo2 クラミジア/ゴノレア	TMA法	RNA

スウェーデンから cryptic plasmid DNA の 377 bp が欠損した変異株が報告⁹⁾された。PCR 法での増幅標的もこの欠損部位に含まれており、この変異株は PCR 法では検出できない。ただ、すでに北欧を含むヨーロッパでは、この変異株も検出が可能な新型のキットに改良されている。日本では、現状では変異株が検出されたとの報告はないが、場合によってはクラミジア・トラコマティスを見逃す可能性もあることから、変異株が存在しているかどうかのサーベイランスが必要となる。

淋菌の検出については、検体として尿道分泌物と子宮頸管スミアは問題がなく、淋菌を検出可能である。ただ、咽頭淋菌感染を疑って咽頭の擦過検体を提出することは避けなければならない。PCR 法を用いたキットでは、口腔内の常在菌を検出する可能性があり¹⁰⁾、実際には淋菌は陰性であるにもかかわらず陽性と判定される。国内用には、このような交差反応がないような改良型のキットがすでに完成しており、近い将来、この問題は解決されると思われる。

PCR 法を用いたキットでは、スウェーデンから報告されている変異株が存在しないという前提では、性器クラミジア感染症の診断は可能である。咽頭感染を疑う場合には、クラミジア・トラコマティスの診断は可能であるが、2012年2月の時点では淋菌の診断には用いることができない。

V SDA 法を用いた診断キット

SDA 法は、PCR 法とは異なった原理の核酸増幅法である。SDA 法は、増幅と検出が同時に進行することが一つの特徴であり、増幅しながらリアルタイムで検出を行うことができる。クラミジア・トラコマティスの増幅標的は PCR 法と同様に cryptic plasmid の一部であるが、PCR 法の増幅標的とは異なる。淋菌の増幅標的は染色体 DNA である。

SDA 法を用いたキットの利点は、前述したように効率的な増幅過程である。したがって、淋菌感染の正確な診断が可能である。

SDA 法を用いたキットの問題点はあまりない。ただ、ごくまれに cryptic plasmid 欠損株が存在することが知られており、そのようなまれな変異株では検出が困難である。

SDA 法を用いたキットでは、性器クラミジア感染症と淋菌感染症の診断は可能である。

VI TMA 法を用いた診断キット

TMA 法は、SDA 法と同様に、PCR 法とは異なった原理の核酸増幅法である。TMA 法は、同じ温度で増幅が進むことから、効率的な増幅が特徴である。クラミジア・トラコマティスの増幅標的は PCR 法と SDA 法とは異なり、23SrRNA であり、淋菌の増幅標的は 16SrRNA である。

TMA 法を用いたキットの利点は、効率的な増幅過程であり、かつ口腔内のナイセリア属との交差反応がないこと¹¹⁾である。したがって、特異性が高く咽頭淋菌感染の正確な診断が可能である。また、1本の検体で、クラミジア・トラコマティスと淋菌の同時検出が可能である。さらに、rRNA の数が非常に多いことから高感度での検出が可能となる。

TMA 法を用いたキットの問題点はあまりない。スウェーデンから報告されたクラミジア・トラコマティスの変異株も、ごくまれに存在する cryptic plasmid 欠損株も検出が可能である。ただ、同時検出のみのキットであることから、クラミジア・トラコマティスか、淋菌か、どちらか一方のみの検出を目的とする場合には、結果として無駄になる。しかし、混合感染も少なからず認められることから、同時検出は大いに意義はある。

TMA 法を用いたキットでは、性器クラミジア感染症、淋菌感染症、そして、咽頭感染の診

断は可能である。

VII 核酸増幅法を用いた診断キットの限界

クラミジア・トラコマティスの診断キットの評価を行う場合に問題となるのが、それぞれの診断・検出法における感度の差である。抗原検査法、培養法、核酸検出法などと比較すると核酸増幅法の感度は10倍以上高い。通常は、培養法が指標となるのであるが、指標となる検査法よりも感度の高い検査法の評価がされることになる。核酸増幅法を用いたキットの評価を行う場合には、評価を行うキットとは異なる原理の核酸増幅法を用いたキットで評価対象キットの判定の確認をするか、まったく別の核酸増幅法で確認を行うことになる。いずれにしても、一つの核酸増幅法のキットのみでは判定しない。したがって、他の微生物の診断キットと比較して、クラミジア・トラコマティスを診断するための核酸増幅法を用いたキットの評価は、より煩雑で費用もかかり、解釈が難しい場合がある。

培養法が、煩雑で熟練が必要であるなど臨床現場での診断法としては用いることが困難であるがために、核酸増幅法を用いたキットが普及してきた訳である。しかし、このために、クラミジア・トラコマティスの菌株を得ることが難しく、変異株や抗菌薬感受性のサーベイランスが行われないうなど、クラミジア・トラコマティスの診断や治療に支障をきたす可能性がある。本来であれば、米国CDCのような国の機関が中心となってシステムを整備し行うべきであるが、残念ながら、日本ではシステム事態が存在しない。ただ、不定期ではあるが、学会レベルでのサーベイランスが行われており、貴重なデータとなっている。

診断には、非常に有効な核酸増幅法であるが、治療確認に用いる場合には注意が必要である。一般的には、治療確認には治療開始2週間後以

降に検査を提出することが推奨されている²⁾。

これは、治療により病原微生物が除菌された後にも局所にはDNAが残存しており、この残存したDNAを検出することにより偽陽性となりうるからである。一方、mRNAは細胞死を反映することから治療確認にはもっとも好ましいが、クラミジア・トラコマティスと淋菌の診断キットは開発されていない。TMA法を用いた診断キットは、rRNAを増幅標的としていることから治療後の微生物の生死を反映するのではないかと期待されたが、むしろ、数が非常に多く、比較的安定していることから、治療後も残存することが明らかとなった¹²⁾。したがって、治療後の治療判定においては、ある程度の期間をおいてから判定しなくてはならない。

核酸増幅法全体に共通しているのは、阻害物質による偽陰性の可能性である。本来、核酸増幅法は純粋に抽出されたDNAを用いて行われるものであるから、血液などが混じった検体では蛋白成分や鉄などの阻害物質により増幅反応が進まなくなる可能性がある。現在の診断キットでは、阻害物質による偽陰性の結果を陽性コントロールで確認できたり、検体処理の過程で阻害物質を取り除くような処理がされるようになった。したがって、偽陰性の可能性は非常に低いと考えられる。ただ、この現象は、核酸増幅法の基本的な特性であり、どうしても起こりうるものなのである。

おわりに

核酸増幅法を用いた診断キットについて、その限界などを挙げた。ただ、現在の診断キットは、きわめて効率が良く、問題となるような事象の発生を最小限にしており、臨床の現場では大いに役立っている。重要なことは、核酸増幅法というものの利点と欠点、特性、限界を理解することが使いこなすことであり、使いこなすことによりさらに有用なツールとなる。

国立感染症研究所でのクラミジア・トラコマティス研究において、多大なるご指導をいただいた若葉こどもクリニックの山崎 勉先生にこの場をお借りして感謝申し上げます。



- 1) 熊本悦明ほか：日本における性感染症サーベイランス—2002年度調査報告—。日本性感染症学会誌 2004；15：17-45
- 2) 性器クラミジア感染症，性感染症 診断・治療ガイドライン 2011。日本性感染症学会誌 2011；22：60-64
- 3) Takahashi S et al：Incidence of sexually transmitted infections in asymptomatic healthy young Japanese men. J Infect Chemother 2005；11：270-273
- 4) 淋菌感染症，性感染症 診断・治療 ガイドライン 2011。日本性感染症学会誌 2011；22：52-59
- 5) Takahashi S et al：Pharyngeal *Neisseria gonorrhoeae* detection in oral-throat wash specimens of male patients with urethritis. J Infect Chemother 2008；14：442-444
- 6) Tanaka M et al：Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and high prevalence of ciprofloxacin-resistant isolates in Japan, 1993 to 1998. J Clin Microbiol 2000；38：521-525
- 7) Ohnishi M, Saika T, Hoshina S：Ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Japan. Emerg Infect Dis 2011；17：148-149
- 8) Cook RL et al：Systematic review：noninvasive testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Ann Intern Med 2005；142：914-925
- 9) Ripa T, Nilsson P：A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid：implications for use of PCR diagnostic tests. Euro Surveill 2006；11：Issue 45, 09 Nov
- 10) Palmer HM et al：Evaluation of the specificities of five DNA amplification methods for the detection of *Neisseria gonorrhoeae*. J Clin Microbiol 2003；41：835-837
- 11) Nagasawa Z et al：Evaluation of APTIMA Combo 2 for cross-reactivity with oropharyngeal *Neisseria* species and other microorganisms. Clinica Chimica Acta 2010；411：776-778
- 12) Renault CA et al：Time to clearance of *Chlamydia trachomatis* ribosomal RNA in women treated for chlamydial infection. Sexual Health 2011；8：69-73

Clinical efficacy of sitafloxacin 100 mg twice daily for 7 days for patients with non-gonococcal urethritis

Satoshi Takahashi, Ryoichi Hamasuna, Mitsuru Yasuda, Shin Ito, Kenji Ito, Shuichi Kawai, Takamasa Yamaguchi, Takashi Satoh, et al.

Journal of Infection and Chemotherapy

Official Journal of the Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases

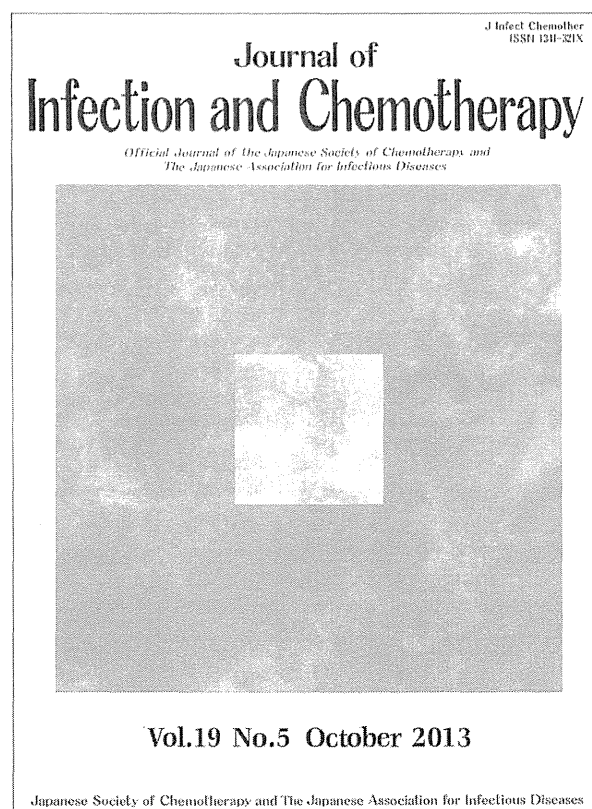
ISSN 1341-321X

Volume 19

Number 5

J Infect Chemother (2013) 19:941-945

DOI 10.1007/s10156-013-0620-y



 Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Clinical efficacy of sitafloxacin 100 mg twice daily for 7 days for patients with non-gonococcal urethritis

Satoshi Takahashi · Ryoichi Hamasuna · Mitsuru Yasuda · Shin Ito · Kenji Ito · Shuichi Kawai · Takamasa Yamaguchi · Takashi Satoh · Kenichi Sunaoshi · Koichi Takeda · Nobukazu Suzuki · Shinichi Maeda · Hirofumi Nishimura · Souichirou Fukuda · Tetsuro Matsumoto

Received: 23 April 2013 / Accepted: 13 May 2013 / Published online: 9 June 2013
© Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases 2013

Abstract To clarify the clinical efficacy of STFX for patients with non-gonococcal urethritis (NGU), including chlamydial urethritis and *Mycoplasma genitalium*-positive urethritis, this study included male patients with NGU who were 20 years old or older. The pathogens, including *Chlamydia trachomatis*, *M. genitalium* and *Ureaplasma urealyticum*, were detected by nucleic acid amplification tests and the patients were treated with sitafloxacin 100 mg twice daily for 7 days. Microbiological and clinical efficacies were assessed for the patients with NGU posttreatment. Among the 208 patients enrolled in this study, data for a total of 118 patients could be analyzed. The median age was 32 (20–61) years. The median duration from the completion of treatment to the second visit was 21 (14–42) days. There were 68 pathogen-positive NGU cases and 50

with NGU without any microbial detection. Microbiological cure was achieved in 95.6 % of the pathogen-positive NGU patients. Total clinical cure was achieved in 91.3 % (105/115). In this study, STFX was able to eradicate 95.7 % of *C. trachomatis*, 93.8 % of *M. genitalium* and 100 % of *U. urealyticum*. The results of our clinical research indicate that the STFX treatment regimen should become a standard regimen recommended for patients with NGU. In addition, this regimen is recommended for patients with *M. genitalium*-positive NGU.

Keywords Urethritis · *Chlamydia trachomatis* · *Mycoplasma genitalium* · *Ureaplasma urealyticum* · Sitafloxacin

S. Takahashi (✉)
Department of Urology, Sapporo Medical University School of Medicine, S1, W16, Chuo-ku, Sapporo 0608543, Japan
e-mail: stakahas@sapmed.ac.jp

S. Takahashi · R. Hamasuna · M. Yasuda · S. Ito · T. Matsumoto
Japanese Research Group for UTI, Kitakyushu, Japan

R. Hamasuna · T. Matsumoto
Department of Urology, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu, Japan

M. Yasuda
Department of Urology, School of Medicine, Gifu University, Gifu, Japan

S. Ito
iClinic, Sendai, Japan

K. Ito
Ito Clinic, Kitakyushu, Japan

S. Kawai
Kawai Urologic Clinic, Kitakyushu, Japan

T. Yamaguchi
Yamaguchi Dermatology and Urology Clinic, Munakata, Japan

T. Satoh
Nisshin Urologic Clinic, Tomakomai, Japan

K. Sunaoshi · K. Takeda · N. Suzuki
Teine Urologic Clinic, Sapporo, Japan

S. Maeda
Department of Urology, Toyota Memorial Hospital, Toyota, Japan

H. Nishimura
Nishimura Urologic Clinic, Kitakyushu, Japan

S. Fukuda
Fukuda Urology Clinic, Miyazaki, Japan

Introduction

The principal pathogen of male non-gonococcal urethritis (NGU) is *Chlamydia trachomatis* [1–3]. To date, a few antimicrobial agents for the treatment of chlamydial urethritis have been highly effective [2–4] and are recommended as standard treatment regimens [5]. *Mycoplasma genitalium* is also a pathogen of male NGU [6] and its frequency as an isolated pathogen from NGU is generally second to that of *C. trachomatis* [2, 3]. Although azithromycin (AZM) 1 g stat, one of the recommended treatment regimens for patients with chlamydial urethritis, has maintained its efficacy for almost all patients with *M. genitalium*-positive NGU, recent reports show that there are some cases with AZM treatment failure due to AZM-resistant strains [7]. When patients with NGU are treated, the ideal treatment regimen must be effective for both *C. trachomatis* and *M. genitalium*. Unfortunately, gatifloxacin (GFLX) [8], which appeared to be an ideal antimicrobial agent, is no longer available because of adverse events, which led to its withdrawal.

Sitafloxacin (STFX) is a new-generation fluoroquinolone and highly active against *C. trachomatis* [9] and *M. genitalium* [10]. Its antimicrobial activity is unique compared to those of conventional fluoroquinolones [11]. Although STFX is expected to have potential efficacy for patients with NGU, few clinical studies have so far been done, though there is one Japanese study [12]. The aim of this study was to clarify the clinical efficacy of STFX for patients with NGU, including chlamydial urethritis and *M. genitalium*-positive urethritis.

Materials and methods

Study design

This prospective, single-arm, open-label, clinical study was done during the period from October 2010 to September 2012.

Patients

This study included heterosexual male patients with NGU who were 20 years old or older. Diagnosis was determined by certified urologists according to the Japanese guidelines for clinical research [13]. They conducted interviews about the symptoms and adverse events and then prescribed the drug. Symptomatic and asymptomatic patients were defined as described in a previous report [3]. In short, symptomatic patients were defined as having urinary tract symptoms including pain on voiding, pus discharge and so on. Asymptomatic patients with NGU were included if

only *C. trachomatis* was detected. These asymptomatic patients commonly visited the clinic because their female sexual partners were diagnosed as having a genital chlamydial infection. Patients were excluded from this study if they had a history of allergy to STFX, renal dysfunction, a history of epilepsy, were infected with *Neisseria gonorrhoeae* or needed other antimicrobial agents. As the treatment, all patients received a 100 mg tablet twice daily for 7 days orally.

Procedures for detection of pathogens

At the clinic, about 20 ml of the first-voided urine (FVU) was taken from each patient and used as a specimen. *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* were detected with the APTIMA COMBO 2 transcription-mediated amplification assay (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA, USA) using 2 ml of the FVU specimen. Then 8 ml of the FVU specimen were stored in a freezer at the laboratory of the Department of Urology, University of Occupational and Environmental Health, Japan, for subsequent detection of *M. genitalium* and *Ureaplasma urealyticum*. Of the 8 ml urine specimen, 1.9 ml was centrifuged at 10 000 g for 15 min and the pellet was mixed with 20 % Chelx 100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). This mixture was heated at 95 °C for 10 min and used as a template for the nucleic acid amplification test [14, 15].

M. genitalium was detected by real-time PCR as described by Jensen [15–17] and specimens that had more than 10 genome equivalents (geq) were determined to be positive for *M. genitalium*. The positive specimens were reexamined by 16S rRNA PCR for confirmation [18]. Isolation of *M. genitalium* was attempted using the urine sediment from positive urine specimens as described previously [17].

U. urealyticum was also detected by real-time PCR (TaqMan assay). The primer for *U. urealyticum* was set on a fragment of the *UreaA* gene. The forward primer used was urea-195F 5'-GCAAGAAGACGTTTAGCTAGAGGTTT-3'. The reverse primer was urea8-r 5'-CACGAGCAGATTGCATTAAGTCAG-3'. The probe was urea8 taqman 5'-FAM-TAATTACTGACCACGTAGTGGA-MGB-3' for *U. urealyticum*. The sequence of the internal process control (IPC) probe used was 5'-TAMRA-TCCTTCGTGATATCGGACGTTGGCTG-BHQ2-3'. The IPC was constructed as in Jensen's method and the same primers and IPC probe as for *M. genitalium* were used. The Taqman assay for *U. urealyticum* was performed using the same conditions as for *M. genitalium* [15]. The specimens that had more than 10 geq of *U. urealyticum* were determined to be positive.

Microbiological outcome

According to the Japanese guidelines for clinical research [13], the primary outcome of whether pathogens, including

C. trachomatis, *M. genitalium* and *U. urealyticum*, are eradicated is determined 2–4 weeks after the completion of treatment [13]. In this study, if patients had no sexual intercourse until the second visit, we accepted the data of patients who revisited at a maximum 6 weeks after the completion of treatment. As the microbiological outcome, microbiological eradication was defined as the pathogen not being detected by posttreatment nucleic acid amplification tests, and failure was defined as the pathogen still being detected by posttreatment nucleic acid amplification tests [13].

Clinical outcome

In the patients with both pathogen-positive NGU and NGU without any microbial detection, the clinical outcome of whether the symptoms derived from urethritis disappeared was determined 2–4 weeks after the completion of treatment. Asymptomatic *C. trachomatis*-positive and *M. genitalium*-positive patients were excluded from the evaluation of the clinical outcome. As the clinical outcome, cure was defined as no posttreatment symptoms being observed and failure was defined as posttreatment symptoms derived from urethritis continuing and/or a change of the treatment regimen being necessary due to an unfavorable clinical course [13].

Assessment of adverse events

At the second visit, all patients were interviewed as to whether adverse events, including abdominal pain, diarrhea, nausea and so on, occurred or not.

Ethical considerations

The details of this research project were approved the Review Board in Sapporo Medical University Hospital (<http://web.sapmed.ac.jp/byoin/chiken/irb.html>; Nos. 22–59, 23–1193, 23–3057) and written informed consent was obtained from each subject. This study was registered in the University Hospital Medical Information Network Clinical Trials Registry (UMIN-CTR; <http://www.umin.ac.jp/ctr/index-j.htm>; UMIN ID: UMIN000004509).

Results

A total of 208 patients who were diagnosed as having NGU were enrolled in this study; however, 90 patients were excluded from further analysis. These 90 patients were divided into 18 patients who were diagnosed with gonococcal urethritis by TMA assay, 36 who failed to visit again and were lost, 34 patients whose second visits were

too early to evaluate the outcome, one patient who had sexual intercourse with his girlfriend before the second visit and one patient whose data were lost. Finally, data for a total of 118 patients with NGU could be analyzed.

The median age of these patients was 32 years (range: 20–61). The median duration from the completion of treatment to the second visit was 21 (14–42) days. There were 68 cases that were positive for the tested microorganisms and 50 without any microbial detection. In pathogen-positive NGU cases, *C. trachomatis*, *M. genitalium* and *U. urealyticum* were detected from 47, 16 and 17 patients, respectively (Table 1). Of the patients with chlamydial NGU, two were diagnosed as having asymptomatic NGU. In the patients with *M. genitalium*-positive NGU, one was asymptomatic. These three patients were excluded from the analysis of the clinical outcome.

Microbiological cure was achieved in 95.6 % of pathogen-positive NGU. The microbiological eradication rates were 95.7 % (45/47), 93.8 % (15/16) and 100 % (17/17) for *C. trachomatis*, *M. genitalium* and *U. urealyticum*, respectively. The two patients with treatment failure for *C. trachomatis*-positive NGU obtained a clinical cure; but the first one was positive for *C. trachomatis* both 14 and 21 days after the completion of drug administration. The second one was positive for *C. trachomatis* 30 days after completion. Those two patients could not undergo additional examinations because they were lost to follow-up. There was one patient with treatment failure for *M. genitalium*-positive NGU who was positive for *M. genitalium* 25 days after the completion of treatment with continuous pyuria and could not undergo further examination because he was lost to follow-up.

Total clinical cure was achieved in 91.3 % (105/115) of the cases. The clinical cure rate for the patients with NGU without any microbial detection was 90.0 % (45/50).

Table 1 Results for microbiological and clinical cures in the patients with NGU

Detected pathogen	Number	Microbiological cure (%)	Clinical cure (%)
<i>C. trachomatis</i>	36	35/36 (97.2 %)	30/34 (88.2 %)
<i>C. trachomatis</i>	4	4/4 (100)	4/4 (100)
<i>M. genitalium</i>			
<i>C. trachomatis</i>	7	6/7 (85.7)	6/7 (85.7)
<i>U. urealyticum</i>			
<i>M. genitalium</i>	11	10/11 (90.9)	10/10 (100)
<i>U. urealyticum</i>	9	9/9 (100)	9/9 (100)
<i>M. genitalium</i>	1	1/1 (100)	1/1 (100)
<i>U. urealyticum</i>			
Total	68	65/68 (95.6)	60/65 (92.3)

In assessment of adverse events, two patients (1.7 %) had mild diarrhea. However, their symptoms were self-limited and disappeared without further medication.

Discussion

The most important current issue in the treatment strategy for patients with NGU has been the management for *M. genitalium*. *C. trachomatis* is the principal pathogen in NGU and treatment efficacy against chlamydial urethritis is high with standard treatment regimens [5, 19]. In Japan, the current standard treatment regimens are still effective for patients with chlamydial urethritis [2, 3]. However, there have been some reports that the standard treatment regimens are not good enough for patients with *M. genitalium*-positive NGU [7, 20]. In addition, surprisingly, a recent report showed that the clinical and microbiological cure rates for patients with NGU were not so high and that treatment failure against *M. genitalium*-positive NGU was common [21, 22]. Therefore, a new treatment regimen for NGU should be developed and applied.

GFLX was one of the new generation fluoroquinolones that had strong activity against both *C. trachomatis* and *M. genitalium* [23]. In addition, an open clinical trial in Japan clearly showed that the clinical efficacy of GFLX against NGU was high [8]. In the study, the microbiological cure rates for *C. trachomatis* and *M. genitalium* were 100 and 83 %, respectively. However, GFLX, which was expected to be a useful agent against NGU, was withdrawn from the FDA list and is no longer available. STFX is also one of the new generation of fluoroquinolones whose activity is better than for the other fluoroquinolones [24] and is active against *C. trachomatis* [9] and *M. genitalium* [10]. Indeed, STFX was expected to have potential efficacy for patients with NGU, because the susceptibility of *M. genitalium* to STFX was higher than to other antimicrobial agents in an in vitro study [10]. In a recent study from Japan [12], the microbiological eradication rates of *C. trachomatis*, *M. genitalium* and *U. urealyticum* were 100 % (33 of 33), 100 % (11 of 11) and 80 % (8 of 10), respectively. In our study, the microbiological eradication rates of *C. trachomatis*, *M. genitalium* and *U. urealyticum* were 95.7, 93.8 and 100 %, respectively. These results in clinical studies clearly showed that the treatment regimen using STFX had high treatment efficacy against NGU and should become a standard treatment regimen for NGU. In Norway and France, the microbiological and clinical efficacies of moxifloxacin (MFLX) were reported. In a microbiological study from Bordeaux, France [25], MFLX was shown to be highly active against urogenital *M. genitalium* and *C. trachomatis*. In a clinical study from Norway [26], all 27 patients who were positive for *M. genitalium* finally tested

negative after the completion of treatment with MFLX 400 mg once daily for 7 days. MFLX is also one of the new generation of fluoroquinolones, similar to STFX, and has higher treatment efficacy than the conventional ones. Unfortunately, however, we cannot prescribe MFLX for patients with NGU, because it is only permitted for patients with respiratory infections in Japan. STFX has activity against *M. genitalium* that is as strong as MFLX in the antimicrobial susceptibility test. Therefore, the results of our study are reasonable.

As supplementary information, if the patients who visited clinic 1–2 weeks after completion of treatment had been included in analysis, the microbiological eradication rates of *C. trachomatis*, *M. genitalium* and *U. urealyticum* would have been 96.7 % (58 of 60), 94.7 % (18 of 19) and 100 % (17 of 17), respectively. These results clearly demonstrate that STFX has high efficacy for treatment of NGU.

In our study, there were few adverse events due to drug action. The main one was mild diarrhea and no one had a serious clinical course. Interestingly, a study including patients with community-acquired pneumonia (CAP) reported that the frequency of adverse STFX reactions was higher than that in our study, and diarrhea occurred in 14.6 % of the patients taking STFX 100 mg sid for 7 days and in 4.17 % of those with STFX 50 mg bid for 7 days [27]. There was no severe event in that study. In the study with CAP, 63.9 % of the patients were 60 years old or older. In our study, the median age of the patients was 32 years. These findings suggest that adverse STFX events, especially diarrhea, occur more frequently in older patients. Although there have been a limited number of studies about STFX, the treatment regimen with STFX can be safely undergone by patients with NGU who are relatively young.

This study has some limitations. The total number of patients included in this study was relatively small. However, the frequency of *M. genitalium* isolation is usually about 7–10 % in NGU in Japan [2, 3, 12]. In a recent study, it was 14.8 % [21] as determined using the same procedures for detection of the organism. The frequency of isolation of *M. genitalium* is relatively so small that it is difficult to study a large number of cases with it in this kind of clinical research. Another limitation is the study design. When the clinical efficacy of antimicrobial agents for urethritis is evaluated, a double-blind, randomized controlled study is ideal to determine the efficacy. However, while AZM 1 g, one of the recommended treatment regimens, can be used for 1-day treatment, the duration of fluoroquinolone treatment is generally a 7-day treatment regimen. Therefore, an exact, strict study design for comparison with AZM is difficult. However, we have various clinical data for NGU and can compare our results with those of our previous reports [2, 3].

In conclusion, our clinical research revealed that the STFX treatment regimen should become the standard one and be recommended for patients with NGU. In addition, this regimen is recommended for patients with *M. genitalium*-positive NGU.

Conflict of interest Tetsuro Matsumoto is a consultant to Daiichi-Sankyo.

References

- Takahashi S, Takeyama K, Kunishima Y, Takeda K, Suzuki N, Nishimura M, et al. Analysis of clinical manifestations of male patients with urethritis. *J Infect Chemother*. 2006;12:283–6.
- Takahashi S, Matsukawa M, Kurimura Y, Takeyama K, Kunishima Y, Iwasawa A, et al. Clinical efficacy of azithromycin for male nongonococcal urethritis. *J Infect Chemother*. 2008;14:409–12.
- Takahashi S, Ichihara K, Hashimoto J, Kurimura Y, Iwasawa A, Hayashi K, et al. Clinical efficacy of levofloxacin 500 mg once daily for 7 days for patients with non-gonococcal urethritis. *J Infect Chemother*. 2011;17:392–6.
- Mena LA, Mroczkowski TF, Nsuami M, Martin DH. A randomized comparison of azithromycin and doxycycline for the treatment of *Mycoplasma genitalium*-positive urethritis in men. *Clin Infect Dis*. 2009;48:1649–54.
- Workowski KA, Berman S, Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. *MMWR Recomm Rep*. 2010;59:1–110.
- Deguchi T, Maeda S. *Mycoplasma genitalium*: another important pathogen of nongonococcal urethritis. *J Urol*. 2002;167:1210–7.
- Jensen JS, Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Hamasuna R. Azithromycin treatment failure in *Mycoplasma genitalium*-positive patients with nongonococcal urethritis is associated with induced macrolide resistance. *Clin Infect Dis*. 2008;47:1546–53.
- Hamasuna R, Takahashi S, Kiyota H, et al. Effect of gatifloxacin against *Mycoplasma genitalium*-related urethritis: an open clinical trial. *Sex Transm Infect*. 2011;87:389–90.
- Miyashita N, Niki Y, Matsushima T. In vitro and in vivo activities of sitafloxacin against *Chlamydia* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:3270–2.
- Hamasuna R, Jensen JS, Osada Y. Antimicrobial susceptibilities of *Mycoplasma genitalium* strains examined by broth dilution and quantitative PCR. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:4938–9.
- Sato K, Hoshino K, Tanaka M, Hayakawa I, Osada Y. Antimicrobial activity of DU-6859, a new potent fluoroquinolone, against clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36:1491–8.
- Ito S, Yasuda M, Seike K, et al. Clinical and microbiological outcomes in treatment of men with non-gonococcal urethritis with a 100-mg twice-daily dose regimen of sitafloxacin. *J Infect Chemother*. 2012;18:414–8.
- Yasuda M, Takahashi S, Kiyota H, et al. Japanese guideline for clinical research of antimicrobial agents on urogenital infections: the first edition. *J Infect Chemother*. 2011;17:579–94.
- Mygind T, Birkelund S, Birkebæk NH, et al. Determination of PCR efficiency in chelex-100 purified clinical samples and comparison of real-time quantitative PCR and conventional PCR for detection of *Chlamydia pneumoniae*. *BMC Microbiol*. 2002;2:17.
- Jensen JS, Bjornelius E, Dohn B, Lidbrink P. Use of TaqMan 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic. *J Clin Microbiol*. 2004;42:683–92.
- Hamasuna R, Osada Y, Jensen JS. Antibiotic susceptibility testing of *Mycoplasma genitalium* by TaqMan 5' nuclease real-time PCR. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:4993–8.
- Hamasuna R, Osada Y, Jensen JS. Isolation of *Mycoplasma genitalium* from first-void urine specimens by coculture with Vero cells. *J Clin Microbiol*. 2007;45:847–50.
- Jensen JS, Borre MB, Dohn B. Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR amplification of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol*. 2003;41:261–6.
- Wang SA, Papp JR, Stamm WE, Peeling RW, Martin DH, Holmes KK. Evaluation of antimicrobial resistance and treatment failures for *Chlamydia trachomatis*: a meeting report. *J Infect Dis*. 2005;191:917–23.
- Yasuda M, Maeda S, Deguchi T. In vitro activity of fluoroquinolones against *Mycoplasma genitalium* and their bacteriological efficacy for treatment of *M. genitalium*-positive nongonococcal urethritis in men. *Clin Infect Dis*. 2005;41:1357–9.
- Manhart LE, Gillespie CW, Lowens MS, et al. Standard treatment regimens for nongonococcal urethritis have similar but declining cure rates: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* 2012 <http://cid.oxfordjournals.org/content/early/2012/11/28/cid.cis1022.full.pdf+html> (Accessed 16 Jan 2013).
- Hamasuna R. Identification of treatment strategies for *Mycoplasma genitalium*-related urethritis in male patients by culturing and antimicrobial susceptibility testing. *J Infect Chemother* 2012 <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10156-012-0487-3> (Accessed 16 Jan 2013).
- Fung-Tomc J, Minassian B, Kolek B, Washo T, Huczko E, Bonner D. In vitro antibacterial spectrum of a new broad-spectrum 8-methoxy fluoroquinolone, gatifloxacin. *J Antimicrob Chemother*. 2000;45:437–46.
- Milatovic D, Schmitz FJ, Brisse S, Verhoef J, Fluit AC. In vitro activities of sitafloxacin (DU-6859a) and six other fluoroquinolones against 8,796 clinical bacterial isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:1102–7.
- Bebear CM, de Barbeyrac B, Pereyre S, Renaudin H, Clerc M, Bebear C. Activity of moxifloxacin against the urogenital mycoplasmas *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis*. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:801–5.
- Jernberg E, Moghaddam A, Moi H. Azithromycin and moxifloxacin for microbiological cure of *Mycoplasma genitalium* infection: an open study. *Int J STD AIDS*. 2008;19:676–9.
- Fujita J, Niki Y, Kadota J, et al. Clinical and bacteriological efficacies of sitafloxacin against community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*: nested cohort within a multicenter clinical trial. *J Infect Chemother* 2012 <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10156-012-0514-4> (accessed 16 Jan 2013).