

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究班  
分担研究報告書（平成 26 年度）

淋菌の薬剤感受性試験についての検討

研究分担者 大西 真 国立感染症研究所細菌第一部 部長  
研究協力者 常 彬 国立感染症研究所細菌第一部 主任研究官  
中山周一 国立感染症研究所細菌第一部 主任研究官  
志牟田 健 国立感染症研究所細菌第一部 主任研究官

研究要旨

淋菌の薬剤感受性試験は GC 寒天基礎培地に適切なサプリメント (IsovitaleX) を加えた培地を用い、平板希釈法を用いて実施する。また、本培地を用いた Etest の利用も認められている。しかしながら、一般の検査室ならびに試験機関においては汎用性の低い本培地を用意し、使用するのには一般的には困難である。そこでチョコレート寒天培地を用いた試験法の妥当性を確認した。結論として、チョコレート寒天培地をもちいた Etest は利用可能性があるが、チョコレート寒天培地を用いたディスク法では GC agar + IsovitaleX を用いたデータの互換性がないことが示された。チョコレート寒天培地を用いたディスク法を準用する際には適切な基準の設定が不可欠である。

A. 研究目的

淋菌感染症に関しては、抗菌剤投薬が必須である。耐性菌の出現で、抗菌剤選択が難しくなってきたことは淋菌感染症だけの固有の問題ではない。他の細菌感染症との最も大きな違いは、淋菌感染症においては再診率を高く維持することが困難で有ること、女性の場合は自覚症状に乏しく治療効果を自己判断する可能性が高いことなどから、ワンショットで確実に治療出来る（95%以上の治療効果が認められる）薬剤を推奨する事となっている点である。このため、サーベイランスで感受性動向を調査していく事で、推奨抗菌剤を選択する事が重要である。また、現実的には分離同定検査よりも核酸検査の感度が高いことから、一般には分離同定試験につづく薬剤感受性試験を実施する機会が激減している。加えて、核酸検査が主体であり、分離・同定・薬剤感受性試験の需要が低いことから、淋菌用培地を備えている検査室も激減していること

から、時に依頼された場合でも実際の実施が困難であることも、薬剤感受性試験の実施の困難さに拍車がかかる悪循環が存在すると推察される。

経口のセファロsporin耐性株の出現とその拡散が2000年以降おこり、現在の第一選択薬はセフトリアキソンとなり、世界中でセフトリアキソンに依存した治療法が選択されている。スペクチノマイシンも利用可能であるが、咽頭に存在する淋菌には効果期待されないことから、伝播を完全に抑えることは難しいとされる。

2009年にセフトリアキソン耐性株が世界ではじめて日本で分離された。分離地である京都、その近隣である大阪においてサーベイランスを実施した結果、その後の拡散は認められていない。しかしながら、耐性とされる基準値に近い感受性株の分離率が徐々に高まってきていることも観察されていた。このため今後は淋菌の薬剤感受性試験の需要が徐々に増加することが考えられる。より汎用性が高い器材をつかった薬剤

感受性試験のプロトコールが設定可能か検討する必要があった。

そこで、本研究ではチョコレート寒天培地あるいは市販の淋菌用生培地を用いた薬剤感受性試験を実施し、そこから得られる結果と標準法を用いた結果との比較解析を実施した。

## B. 研究方法

### 菌株

041, FC0312, ITOH034, HI042, ITOH061, FC0323, FC0339, FC0340, FC0341, FC0363, FC0369, WHO-L 株を用いた。

### 培地

GC 寒天培地(BD 社)、IsoVitalex (BD BBL)、チョコレート寒天培地(Nissui Chocolate agar EXII)、ゴノテスト GC 寒天 (アップル科学)を用いた。

### 薬剤感受性試験

Etest ならびに Disk 法を実施した。Etest ならびに Disk 法は常法にて行った。

## C. 研究結果

1: チョコレート寒天培地を用いた Etest による感受性試験

市販生培地であるチョコレート寒天培地 (Nissui, Chocolate agar EXII) と用いて淋菌の薬剤感受性試験 (Etest) を用いて実施した。セフトリアキソン、アジスロマイシンを含む 6 剤の MIC を淋菌 6 株の成績を表 1 に示した。相違はアジスロマイシンにおいて 6 株中 1 株において 3 倍の差が認められていたが、それ以外では同一あるいは 2 倍以内の差におさまった。

2: 市販淋菌用生培地を用いたアジスロマイシン感受性試験

検査機関から提供された Etest ストリップを用いたアジスロマイシン MIC 値と、感染研で実施し得られた MIC 値が異なり、耐性株判定に問題となることを経験してきた (表 2)。そこで、検査機関から使用器材とプロトコールを入手して、検討を行った。用いている培地と、菌懸濁液を作成するときの溶媒の 2 点が異なることが明らかになり、それぞれの検

証を行った。生食あるいは GC broth により菌懸濁液をそれぞれ OD=0.1 あるいは OD = 0.15 とし用いた場合でも、得られるアジスロマイシン MIC は同値であることが示された。一方で、市販淋菌用生培地を用いて試験を実施すると、アジスロマイシン MIC が標準法である BD 社製の GC agar に IsoVitelex を 1% 添加した培地 (GC 寒天培地-BD) を用いた場合に比較し 4 倍低い MIC 値が得られた (表 3)。参照株 WHO-L を用いた検証から GC 寒天培地-BD から得られる MIC 値が正しい値であることが推察された。

3: チョコレート寒天培地を用いたディスク拡散法

一般の検査室・検査機関で実施可能な方法として、

チョコレート寒天培地を用いたディスク拡散法が考えられる。そこで、Etest および GC 寒天培地-BD を用いて得られた MIC 値 (0.125, 0.094, 0.063  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を示す各 3 株を利用して検討した。それぞれの株を GC 寒天培地-BD およびチョコレート寒天培地を用いてセフトリアキソンが形成する発育阻止円を測定した (図 1)。GC 寒天培地-BD で形成されるそれに比較して、チョコレート寒天培地上で形成される阻止円は小さくなることが示された。

## D. 考察

淋菌の薬剤感受性試験は GC 寒天培地-BD を用いた平板希釈法あるいは Etest が世界的に使用される。また、ディスク法を用いる場合でも GC 寒天培地-BD を用いて、現在最も問題となっているセフトリアキソン感受性株 (CLSI では 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以下) に対する発育阻止円は 35 mm とされる (米国 CDC)。

しかしながら、GC 寒天培地-BD を一般の検査室ならびに試験機関で、淋菌株が分離されるたびに作成することは事実上困難である。淋菌用に市販されている生培地に関しては薬剤感受性試験で用いるためには十分な検証が必要であることを示した。本研究ではセフトリアキソンに関してはチョコレート寒天培地を用いた Etest を準用出来る可能性を示した。また、チョコレート寒

天培地を用いたセフトリアキソンディスクを用いた場合の、判定基準を定めることは困難であった。CLSI の提唱している感受性株の基準、 $0.25 \mu\text{g/ml}$  以下、は現在では臨床的效果と一致しないことが指摘されており、世界的には(米国 CDC も含め)  $0.125 \mu\text{g/ml}$  以下の株の出現、広がりを監視する傾向にある。より詳細な基準を検討する必要があるが、 $30\sim 35 \text{ mm}$  の間に設定することで、 $0.125 \mu\text{g/ml}$  の紛れ込みを最小限として、MIC  $0.125 \mu\text{g/ml}$  より大きい値となる菌株のスクリーニングの可能性はある。

#### E. 結論

薬剤耐性淋菌、特にセフトリアキソン耐性株の監視のための体系的な監視機構を構築する必要がある。公的機関によってどのようなサポートが必要であるか、関わって

行けるか、更なる検討が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

なし.

3.

学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 Etest (GC + IsoVitalex vs Chocolate agar)

	PCG	CFM	CRO	CIP	AZM	SPT
H041	12	6	4	> 32	0.38	8
	16	8	4	> 32	0.38	8
FC0312	1.5	0.25	0.094	> 32	0.5	8
	1.5	0.38	0.064	> 32	0.5	6
ITOH034	0.125	< 0.016	0.006	0.008	0.064	4
	0.125	< 0.016	0.004	0.008	0.19	6
HI042	2	0.125	0.094	> 32	0.5	6
	1.5	0.25	0.094	> 32	0.5	8
ITOH061	1.5	0.25	0.064	> 32	0.38	8
	2	0.19	0.064	> 32	0.38	6
FC0323	1	0.19	0.047	> 32	0.5	8
	1.5	0.19	0.047	> 32	0.5	8

µg/ml

BD GC agar + Isovitalex  
Chocolate agar (Nissui Chocolate agar EXII)

表2 市販淋菌用生培地を用いたアジスロマイシン感受性試験

	NIID protocol	●● protocol
FC-339	1.0	0.25
FC-340	1.0	0.25
FC-341	0.75	0.25
FC-363	0.75	0.25
FC-369	1.0	0.38

## 表3 市販淋菌用生培地を用いたアジスロマイシン感受性試験比較

- 感染研で2つのプロトコールを実施比較

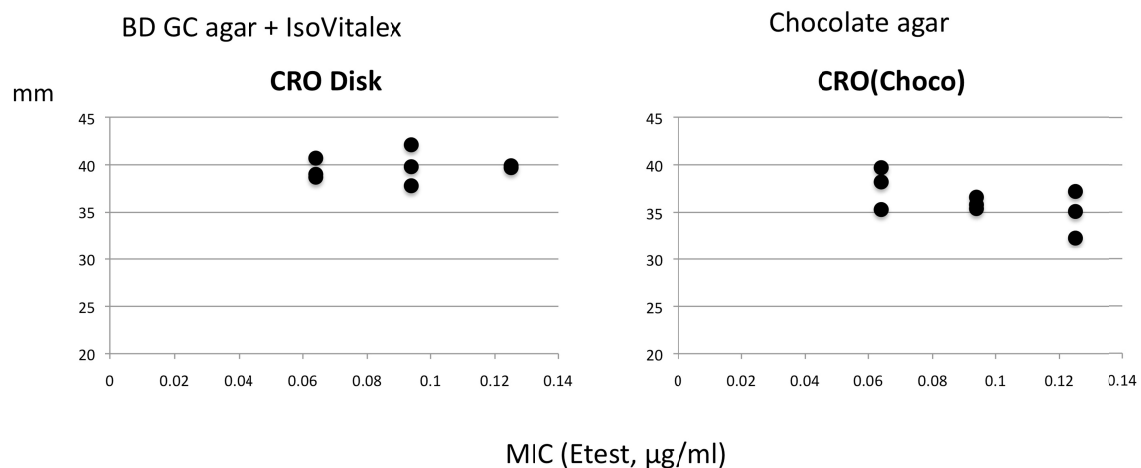
	Saline OD 0.1	GC broth OD 0.15	
BD GC + IsoVitalax	1.0	1.0	
Gonotest Agar	0.25	0.25	µg/ml

BD GC agar, supplemented with 1% BD BBL IsoVitalax enrichment

●●科学「ゴノテストGC寒天」

	BD GC + IsoVialax	Gonotest Agar	
WHO-L (0.5)	0.38	0.125	µg/ml

## 図1 チョコレート寒天培地を用いたディスク拡散法



● CRO disk