

男性尿道炎の病原微生物の多角的検討

【研究分担者】 濱砂 良一（産業医科大学医学部泌尿器科）

研究要旨

非淋菌性尿道炎の原因の一つである *M. genitalium* を尿道炎患者の尿より検出した。さらに、その薬剤耐性に関わる遺伝子の検討により、わが国における *M. genitalium* のマクロライド耐性、キノロン(moxifloxacin, MFLX)耐性に関わる遺伝子の検討により、非淋菌性尿道炎の適切な治療法を検討した。

これまで分離培養された *M. genitalium* 株の薬剤感受性を検討し、23S rRNA、parC および gyrA のキノロン耐性決定遺伝子のシーケンスより、マクロライド耐性、キノロン耐性に関わる遺伝子を検討した。さらに、男性尿道炎患者の尿より *M. genitalium* の検出し、その遺伝子の検討より *M. genitalium* のマクロライド、キノロン(MFLX)に対する耐性率を検討した。

マクロライド耐性は2005-2009年(87)では3.4%であったが、2010-2016年(67)では40.3と増加した。キノロン耐性はparCのSer80にアミノ酸変異を伴う遺伝子変異は、2005-2009年では9.2%、2010-2016年では26.9%であった。このうちSer80→Ileのアミノ酸変異を伴う遺伝子変異は3(2005-2009年)より11(2010-2016年)に増加していた。

非淋菌性尿道炎の原因である *M. genitalium* のマクロライド、キノロン耐性が著しく増加している。特にマクロライド耐性は40%に達しており、今後、マクロライドによる治療は困難となるため、非淋菌性尿道炎に対してマクロライドに代わる治療法を考案する必要がある。

A. 研究目的

非淋菌性尿道炎の原因の一つである *M. genitalium* を尿道炎患者の尿より検出した。さらに、その薬剤耐性に関わる遺伝子の検討により、わが国における *M. genitalium* のマクロライド耐性、キノロン(moxifloxacin, MFLX)耐性に関わる遺伝子の検討により、非淋菌性尿道炎の適切な治療法を検討した。

B. 研究方法

1. これまで分離培養された *M. genitalium* 株および、新たに分離された *M. genitalium* 株を用いてその薬剤感受性を検討した。さらに、23S rRNA、parC および gyrA のキノロン耐性決定遺伝子のシーケンスを行い、マクロライド耐性、キノロン耐性に関わる遺伝子を検討した。
2. 男性尿道炎患者の尿より *M. genitalium* の検出を行った。*M. genitalium* の検出はMgPaの一部を増幅するreal-time PCRにて検出した。さらに、上記耐性遺伝子のシーケンスを行い、わが国の男子尿道炎より分離された *M.*

genitalium のマクロライド、キノロン(MFLX)

に対する耐性率を検討した。

倫理面への配慮：研究の対象は尿より部検出された *M. genitalium* 遺伝子、および分離培養された *M. genitalium* 株であり患者情報は含まれない。

C. 研究結果

我々が保存する *M. genitalium* 株の薬剤感受性測定により、マクロライドに対する高度耐性株、キノロン(MFLX)およびマクロライドともに耐性を示す多剤耐性株を見出した。マクロライド耐性は、これまで報告されたA2058G、A2059Aであった。MFLX耐性株ではgyrAではAsp87→Asn、parCではSer80→Ileのアミノ酸変異を伴う遺伝子変異を認めた。

2005-2009年に分離された87の *M. genitalium* 遺伝子と、2010-2016年に分離された67 *M. genitalium* 遺伝子における耐性遺伝子保有率を検討した。マクロライド耐性は

2005-2009 年では 3.4%であったが、2010-2016 年では 40.3%であった。キノロン耐性では gyrA の変異は 2005-2009 年の分離された 1 株のみに Asp87 の変異を認めた。parC の Ser80 にアミノ酸変異を伴う遺伝子変異は、2005-2009 年では 9.2%、2010-2016 年では 26.9%であった。このうち Ser80→Ile のアミノ酸変異を伴う遺伝子変異は 3 (2005-2009 年) より 11 (2010-2016 年) に増加していた。

D. 考察

非淋菌性尿道炎の原因微生物である *M. genitalium* のマクロライド耐性、キノロン耐性は急激に増加している。もはや *M. genitalium* に対してはマクロライドでの治療は不可能である。さらに海外で *M. genitalium* に有効と考えられる MFLX に対する耐性も増加している。わが国では sitafloxacin は有効であり、本剤に対する耐性株はいまだ分離培養ができていないが、治療失敗例を検討する必要がある。

今後 *M. genitalium* の検出を行うことなく非淋菌性尿道炎の治療を行うことはできない。マクロライドは容易にマクロライド耐性を生むことが考えられるため、今後、非淋菌性尿道炎に対してマクロライドの使用を制限せざるを得ない時期にきていると考える。

E. 結論

非淋菌性尿道炎の原因である *M. genitalium* のマクロライド、キノロン耐性が増加している。特にマクロライド耐性は 40%に達しており、マクロライドによる治療は困難である。今後、マクロライドに代わる治療法を考案する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) C. You, R. Hamasuna, M. Ogawa, K. Fukuda, T. Hachisuga, T. Matsumoto, H. Taniguchi. The first report: An analysis of bacterial flora of the first voided urine specimens of patients with male urethritis using the 16S ribosomal RNA gene-based clone library method Microbial

Pathogenesis 95: 95-100, 2016

- (2) 瀧砂良一. 性感染症. 腎と透析 診療視診 2016 腎と透析 80 (増刊号):507-512, 2016
- (3) 瀧砂良一. 性感染症. 腎と透析 81(4) :585-590, 2016

2. 学会発表

- (1) Hamasuna R, Le PT, Matsumoto M, Fujimoto H, Matsumoto T. The detection of pathogens for non-gonococcal urethritis from the oral cavity of patients with male urethritis. 17th World Congress of IUSTI, 2016/5/8-12. マラケシュ、モロッコ
- (2) R. Hamasuna. Symposium10 Treatment strategies for *M. genitalium* infection-resistant status and new treatment. Multidrug-resistant *M. genitalium* strains. 19th Asian-Pacific IUSTI conference, 2016/12/1-3 岡山 日本
- (3) 瀧砂良一: シンポジウム2 ヒトの臨床におけるマイコプラズマ感染症の多様性と課題. 泌尿器科の立場から— *M. genitalium* の薬剤感受性と耐性化. 第43回日本マイコプラズマ学会学術集会. 2016/6/23-24 長崎
- (4) 瀧砂良一: シンポジウム2 尿道炎原因菌に対する抗菌活性 *Mycoplasma genitalium* の薬剤感受性と治療. 日本性感染症学会 第29回学術大会 2016/12/3-4 岡山 日本

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

男性尿道炎の病原微生物の多角的検討

*Mycoplasma genitalium*の 薬剤感受性と耐性

産業医科大学 泌尿器科
濱砂良一

男子尿道炎からの*M. genitalium*の分離頻度 n:424

	<i>M. genitalium</i>	<i>C. trachomatis</i>
全尿道炎	10.6%	41.7%
淋菌性尿道炎	2.4%	26.8%
非淋菌性尿道炎	14.1%	48.1%
クラミジア性尿道炎	4.9%	100%
非クラミジア性非淋菌性尿道炎	22.7%	0%

Ito, Int J Urol, 23: 325-331, 2016

M. genitalium 研究の問題点

1. 臨床検体からの *M. genitalium* の分離は、極めて困難である
2. 薬剤感受性、感染実験を行うことができる株が少ない
3. 遺伝子による研究が主体である
4. 薬剤耐性と遺伝子変異との関連性が、明白でない

マクロライド系>> テトラサイクリン系
キノロンの薬剤活性には差がある
STFX, MFLX>>LVFX, CPFX>>NFX

														IC90		
STFX			2	2	5	6	7	1						0.06	0.125	
MFLX				1	5	11	5	1						0.06	0.125	
GAFX					2	3	5	11	2					0.25	0.5	
LVFX							1	5	1	11	5			1	2	
CPFX						1	1	1	3	1	3	10	3	4	8	
NFX										2	1	2	18	32	64	
MINO					3	8	9	3						0.125	0.25	
DOXY						7	7	7	1		1			0.125	0.25	
TC						3	11	5	2		1		1	0.125	0.5	
AZM	22													1	0.001	0.002
CAM	9	9	4											1	0.004	0.008

Hamasuna , Int U Urol, 520: 676-84, 2013

Azithromycinとマクロライド耐性 (AZM MIC >32)

	country	before treatment	Treatment	after treatment
1	AUS	WT	AZM 1g stat × 2, AZM 1g/week × 3	A2058G
2	AUS	WT	AZM 1g stat × 2, AZM 1g/week × 3	A2059G
3	AUS	WT	AZM 1g stat, AZM 1g/week × 3	A2059G
4	AUS	WT	AZM 1g stat	A2059G
5	AUS	WT	AZM 1g stat	A2058G
6	AUS	A2058G	AZM 1g stat	A2058G
7	AUS	WT	AZM 1g stat	A2059G
8	SWE	WT	DOXY 100mg 9 day, AZM 1g stat	A2058G
9	SWE	Not done	DOXY 100mg 9 day, AZM 500mg + 250mg/day 4 day, DOXY 200mg 15day AZM 1g /week × 3	A2058C
10	NOR	A2059G	AZM 1g/week × 2	A2059G

Jensen, Clin Infect Dis, 47 : 1546-1553, 2008

マクロライド耐性変異をもつ *M. genitalium*

Author	Year	Country	Number of patients	Prevalence (%)
Chrisment	2012	France	12/115	11.3%
Shimda	2011	Japan	4/25	16.0%
Twin	2012	Australia	16/82	19.5%
Tagg	2013	Australia	62/143	43.3%
Couldwell	2013	Australia	15/32	46.9%
Yew	2011	New Zealand	4/9	44.4%
Anagrius	2013	Sweden	1/8	12.5%
Pond	2014	UK	9/22	40.9%
Kikuchi	2014	Japan	7/68	7.4%
Salado-Rasmussen	2014	Denmark	385/1008	35.5%
Hay	2015	South Africa	4/41	9.8%
Getman	2016	USA	86/178	48.3%
Gratrix	Not published	Canada	30/47	63.8%

もはやマクロライドでの治療は難しい

M. genitalium 分離株の薬剤感受性と遺伝子変異

strains	Mutations of DNA/amino-acid			Antimicrobials (mg/L)						
	QRDR		23S	Fluoroquinolone				Macrolide		
	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	rRNA	CPFX	LVFX	GAFX	MFLX	STFX	AZM	CAM
G37	-	-	-	8	2	0.25	0.063	0.125	0.002	0.004
M2300	-	-	-	4	1	0.5	0.125	0.125	0.0005	0.004
M6257	-	-	A2058G	0.125	0.25	0.031	0.031	0.008	250	128
M6282	-	(C225T) No change (C175T) Pro50→Ser	-	1	0.5	0.063	0.032	0.032	0.001	0.004
M6283	-	(G205A) Ala66→Thr	-	0.5	0.25	0.063	0.063	0.031	0.0002	0.001
M6284	-	-	-	1	0.5	0.125	0.031	0.031	0.0002	0.001
M6285	-	-	-	0.25	0.25	0.031	0.031	0.008	0.0005	0.002
M6286	-	-	-	1	1	0.125	0.063	0.063	0.0005	0.002
M6287	-	(G259T) Asp84→Tyr	-	2	2	0.25	0.25	0.031	0.0005	0.002
M6328	-	-	-	8	2	1	0.125	0.25	0.002	0.008
M6489	(G295A) Asp87→Asn	(G248T) Ser80→Ile	A2059G	>16	>16	>16	16	1	32	32

(*E. coli* numbering)

多剤耐性*M. genitalium* 株の分離、薬剤感受性

		MIC (µg/ml)				
		AZM	EM	CPFX	MFLX	DOXY
M6489	Sweden	>16	>16	>16	>16	1
M6735	Norway	>16	≥64	8	16	1
M6711	Australia	>16	≥64	>16	8	1
M6712	Australia	>16	≥64	>16	8	1
M6714	Norway	>16	≥64	16	4	1

Macrolide resistance: mutation on region V of **23S rRNA**

Fluoroquinolone-resistance: mutations on **quinolone-resistance determining region (QRDR)** on **gyrase** or **topoisomerase IV gene**

Jensen , Antimicrob Agent Chemother, 58(6): 3151-3156, 2014

23S *rRNA* および *gyrA*、*parC* のQRDR におけるmutation (*M. genitalium*-positive 67 検体) 日本, 2010-2016

Gene	Position and mutations	Amino-acid change (<i>E.coli</i> numbering)	Numbers (%)	
23S <i>rRNA</i>	A2058G		9 (14.9)	Macrolide-resistance 40.3%
	A2059G		18 (26.9)	
<i>gyrA</i>	G285A or G285T	Met95 (83)→Ile	3 (4.5)	
<i>parC</i>	C184T	Pro62 (59)→Ser	7 (10.4)	
	G199T	Ala67 (64)→Ser	1 (1.5)	
	G205A	Ala69 (66)→Thr	1 (1.5)	
	G244A	Asp82 (79)→Asn	1 (1.5)	
	A247G	Ser83 (80)→Arg	1 (1.5)	Mutations on Ser83 (80), <i>parC</i> 26.9%
	G248T or G248A	Ser83 (80)→Ile or →Asn	15 (26.9)	
		G259T or G259A or G259C	Asp87 (84)→Tyr or →Asn or →His	4 (6.0)
	C184T plus G248T or G248A	Pro62 (59)→Ser plus Ser83 (80)→Ile or Asn	2 (3.0)	
	C184T plus C356T	Pro62 (59)→Ser plus Ala119 (116)→Val	1 (3.0)	

Multidrug-resistant *M. genitalium*-positive 67 specimens in Japan

	Gene mutations		Patients' numbers
	Azithromycin resistance	Moxifloxacin resistance	
Wild type or other mutations	-	-	35
Mutations on 23S <i>rRNA</i>	+	-	14
Mutations on <i>parC</i>	-	+	5
Mutation on both 23S <i>rRNA</i> and <i>parC</i>	+	+	13

Multi-drug resistance *M. genitalium* in japan 19.4%

23S rRNA, gyrA, parC に薬剤耐性に関連する遺伝子変異をもつ *M. genitalium* の頻度

	2005-2009	2010-2016
23S rRNA A2058G, A2059G	3/87 (3.4%)	27/67 (40.3%)
gyrA Asp87→Asn, Gly	1/87 (1.1%) Asp87→Gly 1	0
parC Ser80→Ile, Asn, Arg,	8/87 (9.2%) Ser80→Ile 3 Ser80→Asn 5	18/67 (26.9%) Ser80→Ile 11 Ser80→Asn 6 Ser80→Arg 1
Multi-drug resistance	0	13/67 (19.4%)

M. genitalium 尿道炎に対する薬剤活性

- マクロライドvs テトラサイクリン
 - マクロライドの抗菌活性は強い
 - しかし、マクロライド耐性が蔓延している(わが国で40%)
 - M. genitalium*を検出できない状態でのマクロライドの使用は、さらに耐性を生む可能性が高い
- キノロン
 - moxifloxacin耐性株が分離
 - わが国でも27%が耐性遺伝子を持つ
 - わが国ではsitafloxacinのみが有効である
 - むやみに使用できない(唯一の有効な抗菌薬)
- 多剤耐性化への道を歩んでいる