

## マイコプラズマ・ジェニタリウムの薬剤耐性遺伝子解析

【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

*Mycoplasma genitalium* の薬剤耐性と遺伝子変異の検討を、臨床検体から分離培養した *M. genitalium* 株を用いて検討した。分離培養した *M. genitalium* 23 株のうち 4 株に 23S rRNA の遺伝子変異を認めた（2 株が A2058G, 2 株が A2059G）。この 4 株に対する azithromycin、chlorithromycin の MIC は  $>16\text{mg/L}$  であり、高度マクロライド耐性であった。ニューキノロンのうち、ciprofloxacin と levofloxacin の MIC range は、 $0.25\sim >16\text{mg/L}$  であり、ほとんどの株がこの 2 剤には耐性である可能性が高かった。moxifloxacin の MIC が  $2\text{mg/L}$  以上の株が 3 株分離され、ParC 遺伝子の quinolone-resistance determining region (QRDR) に Ser83 のアミノ酸変異を伴う遺伝子変異を認めた (Ser83→Ile)。GyrA の QRDR にもアミノ酸変異を伴う遺伝子変異を有したが、3 株とも異なる遺伝子変異であった。これら 3 株の sitafloxacin の MIC は  $1\text{mg/L}$  および  $0.25\text{mg/L}$  であり、sitafloxacin は moxifloxacin に耐性を示す株にも有効である可能性があると考えられた。moxifloxacin に耐性を示す株はすべてマクロライド耐性であり、多剤耐性となっていた。

臨床検体から検出された *M. genitalium* 遺伝子の検討では、23S rRNA の domain V に変異のあるものをマクロライド耐性、ParC 遺伝子の Ser83 のアミノ酸変異を伴う変異をもつものをキノロン耐性と仮定して検討した。マクロライド耐性は 2005-2009 年では 4.8%であったが、2010-2016 年には 42.3%に増加していた。キノロン耐性は 2005-2009 年では 9.5%であったが、2010-2016 年には 26.9%に増加していた。さらに、マクロライド、キノロンに耐性を示すものは、2010-2016 年には 19.4%となっていた。

### A. 研究目的

男子尿道炎のうち、淋菌、クラミジアとも分離されない尿道炎を非クラミジア性非淋菌性尿道炎とよぶ。非クラミジア性非淋菌性尿道炎の原因と考えられる微生物は多数あるが、我が国ではこれらの微生物に対する検査は保険適用がない。従って、臨床医は原因微生物が不明のまま治療を行っているが、近年、抗菌薬による治療失敗例が増加している。非クラミジア性非淋菌性尿道炎の原因微生物なかで最も頻度の高く、薬剤耐性が進行している *Mycoplasma genitalium* について、その薬剤耐性の頻度、薬剤耐性の機序について検討した。

### B. 研究方法

*M. genitalium* の臨床検体からの分離培養は極めて困難である。このなかで、研究分担者が保有する *M. genitalium* 株 20 株に、近年我々が尿道炎患者の尿から分離培養した 3 株の計 23 株の薬

剤感受性およびマクロライド耐性関連遺伝子変異（23S rRNA の domain V における変異）、ニューキノロン耐性関連遺伝子変異（gyrA および parC における quinolone-resistance determining region; QRDR における変異）を検討した。薬剤感受性を検討した抗菌薬はマクロライドでは azithromycin (AZM)、chlorithromycin (CAM)、テトラサイクリンでは doxycycline (DOXY)、minocycline (MINO)、キノロン系では ciprofloxacin (CPFX)、levofloxacin (LVFX)、moxifloxacin (MFLX)、sitafloxacin (STFX) である。

さらに、我々が保存している臨床検体から検出した *M. genitalium* 遺伝子を用いて、マクロライド耐性関連遺伝子変異とニューキノロン耐性関連遺伝子変異を検討し、その変異の割合を検討した。2005-2009 年に検出された 84 遺伝子と、2010-2016 年に検出された 64 遺伝子を検討対象とした。

(倫理面への配慮) M. genitalium 株はすべて、株として保存されており、そのもととなる臨床検体の個人情報をも有しない。

M. genitalium 遺伝子が検出された臨床検体は、匿名化されており、個人を特定する情報は有しない。

### C. 研究結果

分離培養した M. genitalium 23 株のうち 4 株に 23S rRNA の遺伝子変異があった。これらは 2 株が A2058G, 2 株が A2059G であり、すべてマクロライドである AZM、CAM の MIC は >16mg/L とマクロライドに高度耐性を示した。ニューキノロンでは CPRX と LVFX の MIC は、0.25~>16mg/L を示し、多くの株が 1mg/L 以上と耐性と考えられた。MFLX の MIC が 2mg/L 以上の株が 3 株あり、これらはすべて ParC 遺伝子の QRDR に変異があり、Ser83 が Ile へのアミノ酸変異を伴っていた。さらにこれらの 3 株は GyrA の QRDR にもアミノ酸変異を伴う遺伝子変異を有したが、3 株とも異なる遺伝子変異であった。これら 3 株の STFX の MIC は 1mg/L および 0.25mg/L であり、STFX は MFLX に耐性を示す株にも有効である可能性があった。また、MFLX に耐性を示す株はすべてマクロライド耐性であり、多剤耐性となっていた。

臨床検体から検出された M. genitalium 遺伝子の検討を行った。23S rRNA の domain V に変異のあるものをマクロライド耐性、ParC 遺伝子の Ser83 のアミノ酸変異を伴う変異をもつものをキノロン耐性と仮定すると、マクロライド耐性は 2005-2009 年では 4.8% であったが、2010-2016 年には 42.3% に増加していた。キノロン耐性は 2005-2009 年では 9.5% であったが、2010-2016 年には 26.9% に増加していた。さらに、マクロライド、キノロンに耐性を示すものは、2010-2016 年には 19.4% となっていた。

### D. 考察

M. genitalium 株において、マクロライド耐性と 23S rRNA の domain V における変異は関連が高く、これまでの検討と一致していた。MFLX に高い MIC を示す株は、ParC 遺伝子の QRDR における Ser83 のアミノ酸変異が認められ、この変異が MFLX 耐性と関連があると考えられた。さらに、MFLX 耐性と考えられる株はマクロライド耐性であり、M. genitalium は多剤耐性化している可能性が示唆された。

臨床株ではマクロライド耐性、MFLX 耐性株の割合は、2010 年以降、著明に増加しており、多剤耐性化が認められた。

### E. 結論

M. genitalium のマクロライド耐性は 23S rRNA の domain V の遺伝子変異と関連が深いことを再認識した。MFLX 耐性には ParC 遺伝子の QRDR における変異、特に Ser83 のアミノ酸変異を伴う遺伝子変異が重要であることが分かった。

我が国で検出される M. genitalium 遺伝子は、マクロライド耐性、MFLX 耐性が増加し、さらに滞在耐性化していることが明らかとなった。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) 瀧砂良一、性器クラミジア感染症・非クラミジア性非淋菌性尿道炎、泌尿器 Care & Cure URO-Lo 22(4): 79-84, 2017

#### 2. 学会発表

- (1) R. Hamasuna, Symposium 10 Treatment strategies for M. genitalium infection-resistant status and new treatment. Multidrug-resistant M. genitalium strains. 19<sup>th</sup> Asian-Pacific IUSTI conference, 2016/12/1-3 Okayama, Japan
- (2) Hamasuna R, Matsumoto M, PT Le, Fujimoto N, Matsumoto T, The mutations on genes related to macrolide or fluoroquinolone resistance on M. genitalium in Japan, STI&HIV World Congress 2017, 2017/7/9-12, Rio de Janeiro, Burasil

### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

#### 1. 特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

# まとめスライド

産業医科大学 泌尿器科  
(現 国家公務員共済組合 新小倉病院 泌尿器科)  
濱砂良一

1年目

*M. genitalium*の検査法の検討

2年目

*M. genitalium*の薬剤感受性と耐性

臨床検体からの耐性遺伝子の検出

3年目

*M. genitalium*の薬剤感受性と耐性

耐性株の分離

## M. genitaliumの検査

- M. genitaliumは男性の非淋菌性尿道炎の20-30%から分離される細菌である(尿道炎全体の10-15%程度)
- 我が国では検査法、治療法に保険適用なし
- 我が国ではLSI メディエンスから他種のマイコプラズマとのmultiplex PCRが発売されている。

## M. genitaliumの検査法の検討

旭化成ファーマ社 マイコプラズマ抗原キット「リボテスト<sup>®</sup> マイコプラズマ」のM. genitalium検出のための基礎的研究

リボゾーム蛋白 L7/L12の検出キット

Mycoplasma pneumoniae検出用に開発された

咽頭ぬぐい液を用いて、約15分で検出可能

### 交差反応性試験の結果

下記に示すマイコプラズマ属及び他の細菌類に対して本キットを使用したところ、肺炎マイコプラズマ(Mycoplasma pneumoniae)以外に反応性を示したのは Mycoplasma genitaliumのみでした。

マイコプラズマ属	他の細菌類		
Mycoplasma fermentans	Bacillus subtilis	Moraxella catarrhalis	Staphylococcus epidermidis
<b>Mycoplasma genitalium</b>	Chlamydia pneumoniae	Neisseria gonorrhoeae	Streptococcus agalactiae
Mycoplasma hominis	Chlamydia trachomatis	Neisseria lactamica	Streptococcus mitior
Mycoplasma laidlawii	Enterococcus faecalis	Neisseria meningitidis	Streptococcus mitis
Mycoplasma orale	Escherichia coli	Propionibacterium acnes	Streptococcus mutans
Mycoplasma penetrans	Haemophilus influenzae	Proteus mirabilis	Streptococcus pneumoniae
Mycoplasma salivarium	Haemophilus parahaemolyticus	Pseudomonas aeruginosa	Streptococcus pyogenes
	Haemophilus parainfluenzae	Serratia marcescens	Streptococcus salivarius
	Klebsiella pneumoniae	Staphylococcus aureus	Streptococcus sanguis
	Legionella pneumophila		

マイコプラズマ属の濃度は $1.5 \times 10^4$ cfu/mL以上、他の細菌類は $1.0 \times 10^4$ cfu/mLで測定しました。(社内資料)

M. genitaliumと交差反応あり→ M. genitaliumの検出が可能か？

## 結果と結論（1）

菌株	リポテスト結果			菌液中のDNAコピー数			抽出チューブ中のDNAコピー数		
	1倍	10倍	100倍	1倍	10倍	100倍	1倍	10倍	100倍
G37（標準株）	淡い線	陰性	陰性	362980	40901	4058	28126	1780	291
M2282	淡い線	陰性	陰性	118732	15233	1200	144463	549	72
M2300	淡い線	陰性	陰性	243312	23336	5047	8136	1114	98
M2321	淡い線	陰性	陰性	281078	24730	1870	11142	2112	160
M2341	判定不能	陰性	陰性	248401	27409	2365	14611	1220	225
M6257	淡い線	陰性	陰性	156210	13940	945	5471	1112	48
M6280	淡い線	陰性	陰性	258044	20088	1210	13539	1584	247
M6285	比較的濃い線	陰性	陰性	304320	28557	3457	22623	2147	120
M6286	淡い線	陰性	陰性	242903	12069	1208	15678	745	88
M6328	極めて淡い	陰性	陰性	199244	13991	1145	17567	734	107
M6489	極めて淡い	陰性	陰性	102323	6393	656	7955	790	196
M6090	淡い線	陰性	陰性	467403	34197	2474	29632	2448	183
M6151	極めて淡い	陰性	陰性	27846	3009	217	841	147	35
M6282	極めて淡い	陰性	陰性	64160	6789	508	5157	469	73
M6283	淡い線	陰性	陰性	97803	9789	534	13514	1885	102
M6284	淡い線	陰性	陰性	125172	8387	663	5176	340	20
M6287	淡い線	陰性	陰性	131579	1073	800	9737	1668	112

17株中16株で、原液では陽性

感度  $2.0 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5$  DNAコピー

臨床検体の *M. genitalium* のコピー数は  $10 \sim 2 \times 10^7$  コピーであり、主は  $10^3 \sim 10^4$  コピーであり、尿検体では使用できない

## 対象

当科が保存する男性尿道炎患者から分離された *M. genitalium* 23株

- 基準株G37
- 1983年に報告された早期保存株M30
- デンマーク由来株(DK): 4株
- フランス由来株(FR): 3株
- スウェーデン由来株(SE): 7株
- 日本由来株(JP): 7株

## *M. genitalium*の薬剤感受性と耐性 耐性株の分離

### 背景・目的

- *M. genitalium*の薬剤耐性は著しく、マクロライドおよびフルオロキノロンによる治療失敗尿道炎症例が増加している。
- しかし本細菌の分離培養は非常に困難であり、薬剤感受性が測定できる株は限られている。
- 特にモキシフロキサシン（欧州ではマクロライド耐性時の第一選択薬<sup>1)</sup>、日本では適応外）やシタフロキサシンに耐性を示す株の耐性機序は明らかになっていない。
- 保存している*M. genitalium*株の薬剤感受性と遺伝子変異を比較検討した。

1) Sethi S., et al. Infection and drug resistance. 2017;10:283-292.

### 遺伝子変異を認めなかった*M. genitalium*株

Strains	Mutations of DNA/amino acid			Antimicrobials (mg/L)							
	QRDR		23S rRNA	Fluoroquinolone				Tetracycline		Macrolide	
	GyrA	ParC		CPFX	LVFX	MFLX	STFX	DOXY	MINO	AZM	CAM
G37 <sup>T</sup>	-	-	-	8	2	0.06	0.125	0.5	0.5	0.002	0.004
M30	-	-	-	4	1	0.06	0.125	0.5	0.25	0.002	0.008
M2282 DK	-	-	-	4	1	0.06	0.125	0.5	0.25	0.002	0.008
M2300 DK	-	-	-	8	2	0.125	0.25	0.125	0.25	0.001	0.004
M2321 DK	-	-	-	4	2	0.125	0.125	0.5	0.25	0.0005	0.001
M6281 SE	-	-	-	0.5	0.25	0.125	0.03	NT	NT	NT	NT
M6282 JP	-	-	-	1	0.5	0.03	0.03	0.5	0.5	0.001	0.004
M6284 JP	-	-	-	2	1	0.06	0.06	0.125	0.125	0.001	0.004
M6285 SE	-	-	-	0.25	0.25	0.06	0.02	0.25	0.125	0.0005	0.002
M6286 SE	-	-	-	2	1	0.06	0.06	0.25	0.125	0.002	0.008
M6312 FR	-	-	-	8	2	0.125	0.125	NT	NT	NT	NT
M6328 SE	-	-	-	8	2	0.125	0.25	0.5	0.5	0.002	0.008
JMPP4 JP	-	-	-	4	1	0.25	0.06	0.25	0.125	0.002	0.03

DK; Denmark, FR; France, SE; Sweden, JP; Japan

NT; not tested

### 遺伝子変異を認めた*M. genitalium*株

Strains	Mutations of DNA/amino acid			Antimicrobials (mg/L)							
	QRDR		23S rRNA	Fluoroquinolone				Tetracycline		Macrolide	
	GyrA	ParC		CPFX	LVFX	MFLX	STFX	DOXY	MINO	AZM	CAM
M2341 DK	T378C	Pro62→Ser, C234T		0.25	0.25	0.06	0.02	0.5	0.25	0.002	0.008
M6090 FR	A288G			4	2	0.125	0.03	0.06	0.06	0.002	0.008
M6151 FR	A288G			4	1	0.06	0.125	0.5	0.25	0.001	0.008
M6257 SE		-	A2058G	0.25	0.5	0.03	0.016	1	0.5	>16	>16
M6280 SE		Pro62→Ser, C234T		0.5	0.25	0.03	0.03	0.125	0.06	0.0005	0.002
M6283 JP		Ala69→Thr		1	1	0.125	0.06	1	0.5	0.002	0.002
M6287 JP		Asp87→Tyr		4	4	0.5	0.125	0.25	0.125	0.002	0.004
M6489 SE	Asp99→Asn	Ser83→Ile	A2059G	>16	>16	16	1	0.5	0.25	>16	>16
IMC-1 JP	Gly93→Cys	Ser83→Ile	A2059G	>16	>16	4	1	1	0.125	>16	>16
OSSP35-2 JP	Met95→Ile	Ser83→Ile	A2058G	16	8	2	0.25	0.5	0.125	>16	>16

DK; Denmark, FR; France, SE; Sweden, JP; Japan

## 遺伝子変異を認めた*M. genitalium*株

Strains	Mutations of DNA/amino acid			Antimicrobials (mg/L)							
	QRDR		23S rRNA	Fluoroquinolone				Tetracycline		Macrolide	
	GyrA	ParC		CPEX	LVFX	MFLX	STFX	DOXY	MINO	AZM	CAM
M2341 DK	T378C	Pro62→Ser, C234T		0.25	0.25	0.06	0.02	0.5	0.25	0.002	0.008
M6090 FR	A288G			4	2	0.125	0.03	0.06	0.06	0.002	0.008
M6151 FR	A288G			4	1	0.06	0.125	0.5	0.25	0.001	0.008
M6257 SE		-	A2058G	0.25	0.5	0.03	0.016	1	0.5	>16	>16
M6280 SE		Pro62→Ser, C234T		0.5	0.25	0.03	0.03	0.125	0.06	0.0005	0.002
M6283 JP		Ala69→Thr		1	1	0.125	0.06	1	0.5	0.002	0.002
M6287 JP		Asp87→Tyr		4	4	0.5	0.125	0.25	0.125	0.002	0.004
M6489 SE	Asp99→Asn	Ser83→Ile	A2059G	>16	>16	16	1	0.5	0.25	>16	>16
IMC-1 JP	Gly93→Cys	Ser83→Ile	A2059G	>16	>16	4	1	1	0.125	>16	>16
OSSP35-2 JP	Met95→Ile	Ser83→Ile	A2058G	16	8	2	0.25	0.5	0.125	>16	>16

マクロライド耐性→23S rRNAの変異と関連(A2058G, A2059G)

## 遺伝子変異を認めた*M. genitalium*株

Strains	Mutations of DNA/amino acid			Antimicrobials (mg/L)							
	QRDR		23S rRNA	Fluoroquinolone				Tetracycline		Macrolide	
	GyrA	ParC		CPEX	LVFX	MFLX	STFX	DOXY	MINO	AZM	CAM
M2341 DK	T378C	Pro62→Ser, C234T		0.25	0.25	0.06	0.02	0.5	0.25	0.002	0.008
M6090 FR	A288G			4	2	0.125	0.03	0.06	0.06	0.002	0.008
M6151 FR	A288G			4	1	0.06	0.125	0.5	0.25	0.001	0.008
M6257 SE		-	A2058G	0.25	0.5	0.03	0.016	1	0.5	>16	>16
M6280 SE		Pro62→Ser, C234T		0.5	0.25	0.03	0.03	0.125	0.06	0.0005	0.002
M6283 JP		Ala69→Thr		1	1	0.125	0.06	1	0.5	0.002	0.002
M6287 JP		Asp87→Tyr		4	4	0.5	0.125	0.25	0.125	0.002	0.004
M6489 SE	Asp99→Asn	Ser83→Ile	A2059G	>16	>16	16	1	0.5	0.25	>16	>16
IMC-1 JP	Gly93→Cys	Ser83→Ile	A2059G	>16	>16	4	1	1	0.125	>16	>16
OSSP35-2 JP	Met95→Ile	Ser83→Ile	A2058G	16	8	2	0.25	0.5	0.125	>16	>16

Moxifloxacin耐性とParCのSer83→Ile変異は関連がありそう  
GyrAの変異との関連は、現時点では不明



## 結論（２）

- 23S rRNAのdomainVにおけるA2058GまたはA2059G変異はマクロライド耐性に関連している（これまでの報告通り）。
- 男性尿道炎患者から分離された*M. genitalium*において、*ParC*のquinolone-resistance determining regionのSer83→Ile変異はmoxifloxacin耐性に関連がありそうである。

***M. genitalium*の薬剤感受性と耐性**

**臨床検体からの耐性遺伝子の検出**

## 臨床検体からの*M. genitalium*耐性遺伝子の検討

### マクロライド耐性

23S rRNAのA2058, A2059に変異を認めるもの  
A2058G, A2059G

### キノロン耐性

ParC のキノロン耐性決定遺伝子に変異があり  
Ser83にアミノ酸変異を伴うもの  
Ser83→Ile, Asn, Arg

### 多剤耐性

マクロライド耐性、キノロン耐性を同時に持つもの

## 尿検体から検出された*M. genitalium*遺伝子のうち、マクロライド、キノロン耐性関連の遺伝子変異をもつ頻度 (産業医大保有遺伝子の検討)

	2005-2009 (84)	2010-2016 (64)
<b>23S rRNA</b>		
A2058G, A2059G	4/87 (4.8%)	27/67 (42.3%)
<b>gyrA</b>		
Gly93→Cys	0/87 (0%)	3/67 (4.8%)
Met95→Ile		1
		2
<b>parC</b>		
Ser83→Ile	8/87 (9.5%)	18/67 (26.9%)
Asn	3	10
Arg	5	6
	0	1
<b>Multi-drug resistance</b>		
	0	13/67 (19.4%)

## 結論 (3)

男性尿道炎患者から分離された*M. genitalium*遺伝子の検討で、マクロライド耐性関連遺伝子を持つ頻度は、2005-2009年の4.6%から2010-2016年には42.3%に明らかに増加した。

キノロン、特にmoxifloxacin耐性の関連遺伝子は決定していないが、83番目のSerineの変異が関連がありそうである。この部位に変異を持つものをキノロン耐性とする、2005-2009年の9.5%から2010-2016年には26.9%に増加した。

マクロライドとキノロン耐性関連遺伝子を共に持つものは、2010-2016年には19.4%であった。