

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 pneumoniae 検出キットである「リボテスト マイコプラズマ」を用いて、乳中の Mycoplasma genitalium を検出できないかを基礎的に検討したが、その検出感度は $2.0 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5$ コピーであり尿からの M. genitalium の検出の使用は困難であった。

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 2mg/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 1mg/L および 0.25mg/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

(1) Mycoplasma genitalium を検出するための検査法の検討

(2) M. genitalium の薬剤耐性遺伝子の解析と我が国における耐性状況の検討

B. 研究方法

(1) Mycoplasma pneumoniae を検出するための簡易キットが、M. genitalium 検出に有用かどうかの基礎研究を行った。「リボテスト マイコプラズマ」(旭化成ファーマ)を用いて、M. genitalium 株の懸濁液との反応を検討し、その感度を検討した。M. genitalium 株の懸濁液と「リボテスト」を反応させ、懸濁液中の M. genitalium の DNA コピー数を測定し、検出限界を検討した。

(2) M. genitalium の臨床検体からの分離培養は極めて困難であるが、研究分担者が保有する M. genitalium 株 20 株に、近年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。

(3) 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、臨床検体の個人情報を有しない。

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

(1) 17株の M. genitalium の懸濁液を「リボテスト」で反応させると、17株中16株で陽性となった。しかし、懸濁液を10倍希釈すると、いずれも反応せず、感度は $2.0 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5$ コピーと判断した。

(2) 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(2株が A2058G, 2株が A2059G)。4株はすべて AZM, CAM の MIC は $>16\text{mg/L}$ 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、 $0.25 \sim >16\text{mg/L}$ 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3株は、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 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。

(3) 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

(1) 「リボテスト マイコプラズマ」は M. genitalium の懸濁液中 10^5 DNA コピーが検出限界であった。尿中の M. genitalium の DNA コピー

数は、我々の検討では $10-10^6$ DNA コピー/ml であり、 $10-10^3$ コピー/ml の検体が多かった。従って、本キットでは、ほとんどの検体で陰性を示す可能性が高く、臨床使用はできないと考えられた。

(2) 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。

(3) 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

(1) 「リボテスト マイコプラズマ」は尿からの M. genitalium の検出の使用は困難であった。

(2) 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。

(3) 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、さらに多剤耐性化していることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 瀧砂良一. 性感染症. 腎と透析 診療指針 2016 腎と透析 80 (増刊号):507-512, 2016
- (2) 瀧砂良一. 性感染症. 腎と透析 81(4) :585-590, 2016
- (3) 瀧砂良一. 感染症 最新の治療 2016-2018, 藤田次郎・竹末芳生・舘田一弘 編集 VI 主な臓器別感染症 M 性感染症 1. 淋菌感染症 p249-251 株式会社南江堂 東京 2016
- (4) 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) 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 Cngress of IUSTI, Morroco, 2016

- (2) (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 Okayama, Japan
- (3) 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

G. 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