

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591788

研究課題名（和文） 淋菌におけるアジスロマイシン耐性化の経時的変化および耐性化機序の解析

研究課題名（英文） Survey of chronological changes of azithromycin resistance and analyses of azithromycin resistance mechanisms in clinical strains of *Neisseria gonorrhoeae*

研究代表者

出口 隆 (DEGUCHI TAKASHI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40163935

研究成果の概要（和文）：

淋菌臨床分離株に対するアジスロマイシンの感受性の検討では、2010年、2011年と2012年の分離菌に対する50%および90%の菌株の発育を抑制する濃度、MIC50とMIC90は、それぞれ0.25 µg/mlと0.5 µg/ml、0.5 µg/mlと1 µg/ml、0.25 µg/mlと1 µg/mlであった。アジスロマイシンの耐性化機序の解析では、アジスロマイシン耐性に関連する23S rRNA遺伝子の変異を認めた。本研究において、アジスロマイシンに対する中等度耐性菌が既に日本で出現していることとその耐性機序として23S rRNA遺伝子の変異であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Clinical strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in 2010, 2011 and 2012 were examined for antimicrobial susceptibility to azithromycin. The MIC50 and MIC90, which were defined as minimum concentrations inhibiting the growth of 50% and 90% of the isolates, were 0.25 µg/ml and 0.5 µg/ml, 0.5 µg/ml and 1 µg/ml, and 0.25 µg/ml and 1 µg/ml for the isolates in 2010, 2011, and 2012, respectively. The 23S rRNA genes in the strains were examined for the presence of azithromycin resistance-associated mutations. Our current study demonstrated that some clinical strains with intermediate resistance to azithromycin have emerged in Japan and that the resistance was associated with the mutation in the 23S rRNA gene.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：感染症学・性感染症

### 1. 研究開始当初の背景

ペニシリン耐性やテトラサイクリン耐性淋菌の出現以来、ニューキノロン剤やセファロスポリン剤が淋菌感染症の治療薬として推奨されてきた。ニューキノロン剤は、淋菌感染症に対して優れた有効性を発揮してきたが、1990年代半ばよりニューキノロン剤耐性菌の出現が報告され、以後、耐性菌の著大な増加が認められている。現在では、ニューキノロン剤の淋菌感染症の治療薬としての臨床的有用性は低下し、その使用は推奨されていない。淋菌のニューキノロン剤耐性化後は、セファロスポリン剤が淋菌感染症の重要な治療薬として繁用されてきたが、経口セファロスポリン剤に対する感受性の低下した淋菌臨床分離株が出現し始め、臨床上問題となってきた。このような経口薬耐性淋菌の増加によりもはや淋菌感染症の内服薬による治療は著しく困難となっている。このような状況下で、2009年に淋菌性尿道炎を含む淋菌感染症に対してアジスロマイシン 2gによる内服治療の保険適用が認められた。しかしながら、海外においては淋菌のアジスロマイシンに対する低感受性化の報告が見られ、日本においてもその感受性の低下が報告されている。さらに、2009年にはイギリスにおいてアジスロマイシン高度耐性淋菌の出現が報告されている。

### 2. 研究の目的

淋菌臨床分離株に対するアジスロマイシンを含む各種抗菌薬の感受性を解析し、アジスロマイシン 2gが使用可能となった2009年以降の臨床分離株についても同様の検討を加え、アジスロマイシン耐性化の傾向を検討した。その上で、アジスロマイシン耐性淋菌については、その耐性機序について分子生物学的手法を用いて解析した。

### 3. 研究の方法

岐阜大学医学部附属病院および岐阜県（10施設）、愛知県（3施設）および静岡県（1施設）下の関連病院の泌尿器科を受診した淋菌性尿道炎患者より分離された淋菌臨床分離株を収集した。2010年、2011年と2012年に収集した淋菌臨床分離株の内、それぞれ再同定した178株、224株と273株に対するセフェキシム（CFIX）、セフトリアキソン

（CTRX）、レボフロキサシン（LVFX）、アジスロマイシン（AZM）の発育阻止濃度（MIC）を測定して、2002年に分離された221株の淋菌臨床分離株に対するMICとの比較を行った。

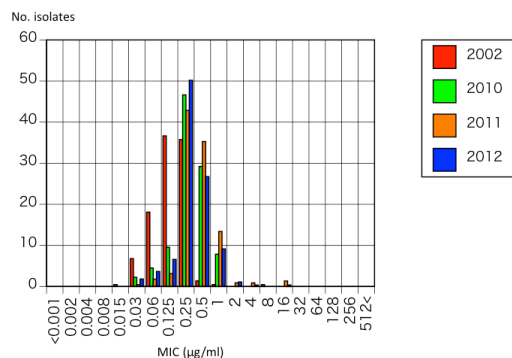
マクロライドの耐性機構は、ribosomeの変化による薬剤とribosomeとの親和性の変化、関連する酵素系の変化、efflux pumpの発現の亢進による細胞内へのマクロライド濃度の低下などが考えられる。本研究では、主に、23S rRNAのdomain Vにおけるpeptidyltransferase loopの変化を検索した。アジスロマイシンのMIC 1 µg/ml以上を示す菌株の23S rRNA遺伝子をPCR法により増幅し塩基配列を決定した。

### 4. 研究成果

2002年の淋菌臨床分離株に対する各種薬剤のMIC50 (µg/ml) とMIC90 (µg/ml) は、それぞれ、ペニシリン G (PCG)、2、8、セフィキシム (CFIX)、0.06、0.5、セフトリアキソン (CTRX)、0.06、0.125、レボフロキサシン (LVFX)、8、16 とアジスロマイシン (AZM)、0.125、0.25であった。それに対して、2010年、2011年と2012年の分離菌株に対する50%および90%の菌株の発育を抑制する濃度、MIC50 (µg/ml) とMIC90 (µg/ml) を表に示す。

薬剤	2010年分離株		2011年分離株		2012年分離株	
	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90
PCG	2	8	4	8	2	8
CFIX	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5
CTRX	0.06	0.25	0.125	0.25	0.06	0.125
LVFX	8	16	8	16	8	16
AZM	0.25	0.5	0.5	1	0.25	1

アジスロマイシンに関しては、2010年、2011年と2012年の分離菌に対するMICの範囲は、それぞれ、0.03-1 µg/ml、0.03-16 µg/mlと0.03-16 µg/mlであった。2002年の臨床分離菌株と比較してアジスロマイシンに対する感受性の低下が観察されたが、近年、ヨーロッパおよび南米で観察されているアジスロマイシン高度耐性菌は分離されなかった。



アジスロマイシンの耐性化機序の解析は、2010年度から2012年に収集した淋菌臨床分離株を対象として、アジスロマイシンのMICが1-16 µg/mlの菌株よりDNAを抽出して、23S rRNA遺伝子の変異を検討した。MICが4 µg/mlの1株と16 µg/mlの2株でallele 1からallele 4のすべてにおいて遺伝子変化を認めた。MICが1 µg/mlの1株と16 µg/mlの1株で3箇所のalleleに遺伝子変化を認めた。さらに、MICが1 µg/mlの1株と2 µg/mlの1株に2箇所のalleleに遺伝子変化を認めた。ただし、海外で報告されているアジスロマイシン高度耐性菌における23S rRNA遺伝子の変異とは異なる部位の変異であった。

MIC of AZM	No.	Allele of the 23S rRNA gene			
		1	2	3	4
1	66	wt	wt	wt	wt
1	1	wt	C2611T	wt	C2611T
1	1	wt	C2611T	C2611T	C2611T
2	4	wt	wt	wt	wt
2	1	C2611T	wt	wt	C2611T
4	2	wt	wt	wt	wt
4	1	C2611T	C2611T	C2611T	C2611T
16	1	C2611T	C2611T	wt	C2611T
16	2	C2611T	C2611T	C2611T	C2611T

wt, wild type.

日本においては、アジスロマイシン高度耐性菌の出現の報告は現時点では無いが、本研究でアジスロマイシンに対する中等度耐性菌が既に出現していることを明らかにした。さらに、その耐性機序として23S rRNA遺伝子の変異であることを明らかにした。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Deguchi T, Yasuda M, Ito S. Management of pharyngeal gonorrhoea is crucial to prevent the emergence and spread of

antibiotic-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 査読有、56 巻、2012、4039-4040

- ② Deguchi T, Nakane K, Yasuda M, Maeda S-I. Emergence and spread of drug resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Urology*, 査読有、184 巻、2010、851-858

[学会発表] (計 10 件)

- ① 安田 満, 淋菌感染症 -現状と治療戦略-, 第 101 回日本泌尿器科学会総会、2013 年 4 月 25 日、札幌
- ② 出口 隆, 男子尿道炎、第 60 回日本化学療法学会学術総会、2012 年 4 月 26 日、長崎
- ③ Yasuda M, Nakane K, Hagiwara S, Ishihara S, Maeda S, Ito S, Deguchi T. Remarkable increase of *Neisseria gonorrhoeae* with decreased susceptibility to azithromycin in Japan. 21<sup>st</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases/27<sup>th</sup> International Congress of Chemotherapy, May 8, 2011, Milan, Italy

[図書] (計 1 件)

- ① 出口 隆, 南江堂、感染症専門医テキスト 第 I 部 解説編、2011、707-713

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

出口 隆 (DEGUCHI TAKASHI)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：40163935

### (2) 研究分担者

安田 満 (YASUDA MITSURU)  
岐阜大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：90311703  
中根 慶太 (NAKANE KEITA)  
岐阜大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：00566482