

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293337

研究課題名(和文) 非淋菌性尿道炎に関わる細菌およびウイルスの疫学、治療に関する総括的研究

研究課題名(英文) Epidemiological and therapeutical study of pathogens associated to non-gonococcal urethritis

研究代表者

松本 哲朗 (MATSUMOTO, TETSURO)

産業医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：50150420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：男性尿道炎検体からは、淋菌やクラミジア以外に、多くの原因不明の病原体が検出されるが、その詳細は未解決である。

尿道炎原因菌の新しい解析法として、clone library法を用いた。本法は手遺伝子増幅法による定性的検討に定量的概念を加えるものであり、淋菌とM.genitaliumの病原性は明らかとなった、さらにH. influenzaやN. meningitidisも病原体となる可能性がある。

男性尿道炎患者の口腔内検体の検討を行い、男性の口腔より尿道炎の原因菌および女性膣内の常在菌や病原体が検出された。男性尿道炎の原因菌は、女性膣および口腔内の細菌の尿道への感染を考慮する必要がある。

研究成果の概要(英文)：From the specimens of male urethritis, many kinds of microorganisms are detected, but the pathogenicities of microorganisms except for N. gonorrhoeae or C. trachomatis has not been determined.

As the new approach, the clone library method was used for analysis of microorganisms of urethritis. This method added quantitative concept to qualitative PCR methods. By this method, the pathogenicities of N. gonorrhoeae and M. genitalium to the male urethra was confirmed. In addition, it was found that H. influenzae and N. meningitidis would be possible pathogens for male urethritis.

By the examination of microorganisms in the oral cavities of patients with male urethritis, it was found that causative bacteria of male urethritis and bacteria of the resident flora in the vagina were detected in the oral cavities of male patients. these indicated that oral sex is closely related to STIs. When we treat male urethritis, we have to eradicate microorganisms in both the urethra and oral cavities.

研究分野：性感染症、尿路感染症

キーワード：尿道炎 病原性 M. genitalium clone library 口腔内細菌 T. vaginalis

1. 研究開始当初の背景

(1) 男子尿道炎は男性の性感染症の中で最も頻度が高く、重要な疾患である。わが国では、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) が検出されない尿道炎 (非淋菌性尿道炎) の割合は約 70% である。非淋菌性尿道炎の原因微生物は、*Chlamydia trachomatis* の頻度が高く、非淋菌性尿道炎の約 40-50% を占める。*C. trachomatis* に対する検査、治療は、わが国では保険適用となっており、核酸増幅法などの検査法が確立されている。治療法はマクロライド、テトラサイクリン、ニューキノロンが有効であり、その治療効果は 90% を上回る。しかし、淋菌も *C. trachomatis* も検出されない残りの尿道炎 (非クラミジア性非淋菌性尿道炎: NCNGU) の原因微生物に対する検査は保険適用がない。このため原因不明の尿道炎に対しては、経験を頼りに治療を行っているのが現実である。この状況は女性の子宮頸管炎でも同様な状況である。

(2) これらの NCNGU の原因菌候補としては、*Mycoplasma genitalium*、*Ureaplasma urealyticum*、*Ureaplasma parvum*、*Mycoplasma hominis*、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) などの細菌、*Trichomonas vaginalis* など原虫、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、ヒトパピローマウイルスなどのウイルスなどがあげられている。これらのうち、*M. genitalium* と *T. vaginalis* はすでにアメリカ CDC や英国性病学会などのガイドラインで、原因菌として取り上げられており、その治療法が議論となっている。*M. genitalium* はマクロライド、テトラサイクリンに対する耐性率が上昇し、*C. trachomatis* と同じ治療法では治療が難しくなりつつある。また、原因がウイルスの場合、抗菌薬が無効となるのは当然である。しかし、わが国ではこれらの原因菌の存在を無視し、一括に NCNGU として治療を行っていることとなっている。また、わが国において、これらの原因微生物の調査はほとんど検討されたことはない。

(3) これら NCNGU の原因微生物が複雑で多

岐に及ぶようになった理由のひとつに、オーラルセックスの存在が考えられている。つまり、口腔内の微生物が、性器に対して病原性を持つようになったということである。オーラルセックスは性的に活動的な若者を中心に広く一般化している。淋菌および *C. trachomatis* において、性風俗女性の咽頭感染と、男子淋菌性およびクラミジア性尿道炎と関連があることを我々は報告してきた。また、ホモセクシュアル男性においても淋菌の咽頭感染と淋菌性尿道炎との関連が報告されている。近年では、ヘテロセクシュアルの男子尿道炎患者の咽頭からも、淋菌および *C. trachomatis* が尿道から分離されることがわかってきた (Hamasuna, J Infect Chemother, 2012)。また、口腔内の常在菌である *N. meningitidis* による男性尿道炎の症例報告がなされている。*Streptococcus* 属などの口腔内の常在菌も尿道炎患者から分離されることがあるが、尿道炎と口腔細菌の関連はいまだに明らかではない。ウイルスに関しては、本来口唇ヘルペスの原因である herpes simplex virus-1 が高い頻度で性器ヘルペスより分離されている。また、子宮頸癌との密接な関連が指摘されている human papilloma virus が、咽頭癌の原因となりうるということが注目されている。これらを考慮すると、性感染症の病原微生物の病因、病態を検討するためには、性器の微生物と咽頭の微生物とは同時に検討する必要があると考える。

2. 研究の目的

(1) 男性の性感染症の中でも非淋菌性尿道炎は最も頻度の高い疾患である。このなかで、クラミジアが検出されない NCNGU の原因微生物およびその治療法は確定していない。数多くの種類の微生物が原因となっている可能性が高いが、わが国において、男性尿道炎においてこれらの微生物に対する検査法には保険が適用されておらず、臨床医は経験のみに基づいた治療を行っている。従って、本研究の第一の目的は、NCNGU の原因微生物

物を確定することを主たる目的とする。さらにその確立に必要な検査法も確立するとともに、さらにその適切な治療法を結果に応じて検討し、治療法の確立を目指す。

(2) 尿道炎の感染源として、性器とともに咽頭が大きな割合を占めることがわかってきた。さらに、口腔内微生物が尿道に感染し、尿道炎の原因微生物を複雑にしている。本研究の第二の目的は、咽頭微生物の尿道炎に対する関わりを明らかにすることである。さらに、女性のみならず男性の咽頭細菌がどのように性感染症へ関連しているか、口腔内微生物に対して治療が必要かどうか、適切な治療法はどのようなものであるかどうかを明らかにとする。

3. 研究の方法

(1) 男性尿道炎における原因微生物の検討。
男性尿道炎の原因微生物を検討するため、男性尿道炎患者の初尿を採取した。採取した初尿検体 (first voided urine:FVU) より、淋菌および *C. trachomatis* を TMA 法にて検出した。さらに、*M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* を real-time PCR 法にて検出した (これらを総括して conventional PCR と呼ぶ)。さらに、本検体を用いて、clone library 法による検討を行った。Clone library 法は 16S rRNA を増幅する核酸増幅法の一つである。Universal primer (universal primers E341F and E907R) を使用し、増幅した複製物をランダムに 96 個選択し、大腸菌に遺伝子導入し、再度 PCR を行い 16S rRNA のシーケンスを a basic local alignment search tool (BLAST) を用いてホモロジー検索を行い、微生物の phenotyping を決定する。これにより、96 個の遺伝子に含まれる微生物の割合が決定される。このなかで 1 検体中の含まれる遺伝子の割合が多いものを「有意菌」として判断すると、検体中の含まれる尿検体中で増殖する細菌の割合が判定される。つまり、定性的であ

る PCR を用いた検査法に、定量的な要素を加えることとなり、尿道炎の原因菌検索の新たな方法となることが想定できた。さらに、TMA 法や RT-PCR 法による原因菌検索と clone library 法を比較することで、定量的手法の有用性が確認できるものと考えている。

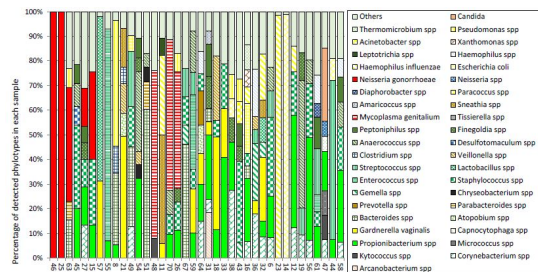
(2) 口腔内細菌と尿道炎原因菌との関連

男性の口腔内細菌と尿道炎原因菌との関連を検討するために、尿道炎患者の FVU とうがい液 (oral wash fluid: OWF) を治療前後で採取した。さらに対象として医療従事者および他疾患の患者の FVU および OWF を採取した。これらの検体を用いて、検体中から淋菌および *C. trachomatis* を TMA 法にて、さらに、*M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum*, *U. parvum*, *Trichomonas vaginalis* および *Gardnerella vaginalis* を real-time PCR 法にて検出した。また、患者および対象者の性活動調査、尿道炎患者に対する治療法、治療期間中の性活動調査を行った。

4. 研究成果

(1) 尿道炎の原因菌解析のため、58 名の尿道炎患者の FVU を採取した。患者の症状は、排膿 56.9%、尿道痛 46.6%、尿道不快感 46.6%、尿道掻痒感 24.1%、尿道異物感 17.2% でありすべて FVU 中の膿尿は 5 個/hpf 以上であった。このうち、38 検体が clone library 法による解析が可能であったため、38 検体を対象に解析を行った。

これらの検体より 2427 クローン、95 phenotype を検出した。細菌では 16 phenotype は嫌気性菌、33 phenotype はグラム陽性菌、42 phenotype はグラム陰性菌、1 phenotype は判定不能、1 phenotype は真菌、1 phenotype は藻類に分類された。図に検体中の 5% 以上を占めていた細菌の分布を示す。



尿道炎の原因菌別に検討すると、淋菌は6検体から検出され、5検体で「優位菌」であった。Conventional PCR法でも、同様に検出され、2検体では100%を占めることから、淋菌の尿道炎に対する病原性は明らかであると考えられた。一方、*C. trachomatis*は、conventional PCR法では15検体で陽性を示すのに対して、clone library法では1検体で陽性であり、さらに検体中に占める割合も、わずか3%を占めにすぎなかった。*C. trachomatis*検出に関しては、primerにミスマッチが起こっている可能性はあるが、これまで論じられるように、*C. trachomatis*は尿道炎の発症において補足的役割をはたす可能性があり、今後の詳細な検討が必要である。*M. genitalium*はconventional PCR法で12検体から検出されていたが、clone library法では5検体のみであった。しかし、clone library法で検出された検体では2検体で遺伝子中の50%以上を占めており、尿道炎原因菌の可能性は高いと思われた。*U. urealyticum*、*U. parvum*、*M. hominis*は、conventional PCR法では15検体から検出されるものの、clone library法では2検体より*U. parvum*遺伝子が、少量検出されたにすぎず、病原性は低いと考えられた。これら以外の細菌では、*H. influenzae*と*N. meningitidis*がclone library法では8検体から分離され、1検体では第一有意菌、2検体では第二有意菌であり、原因菌である可能性を示す結果であった。以上より、clone library法による尿道炎原因菌の検討は有用性が高く、今後症例数を増加して検討すれば、さらに色々な事実が発見されると思われた。

(2) 男性における口腔内細菌と尿道炎原因菌との関連性の検討

男性尿道炎患者92名、対象16名における検討を行った。性活動調査では、尿道炎患者で明らかに性活動が高かった。これらの患者および対象からの病原体検出は、FVUからは*C. trachomatis* (37.0%)の分離頻度が最も高く、次いで淋菌(30.4%)、*G. vaginalis* (15.2%)の順であった。一方OWFからは*G. vaginalis* (15.2%)が最も多く分離され、次いで淋菌(12.6%)、*U. urealyticum* (12.0%)の順であった。対象からはFVUより*G. vaginalis* (29.4%)が最も分離されたが、OWFからは*U. parvum*が1検体(5.7%)より分離されたのみであった。尿道炎患者の口腔検体から多くの尿道炎からの分離菌が検出されることは、男女においてオーラルセックスが盛んに行われており、尿道炎の原因菌が口腔内を汚染していることが明らかとなった。

これらの患者は抗菌薬により治療されるも、治療後OWFから高い頻度で検出された。*G. vaginalis*は治療後54.4%の症例で検出されており、膣内、尿道内の常在菌となっている可能性が示唆された。治療前にOWFより検出された細菌が治療後に残存する頻度は、淋菌で28.6% (2/7)、*C. trachomatis*で100% (1/1)、*G. vaginalis*で63.3% (7/11)であった。これらは一般の尿道炎治療では口腔内の病原菌を同時に殺菌することはできないことを意味し、これまでの尿道炎治療を見直す時期に来ていると考える。

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 11件)

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*, 査読あり 95: 2016、95-100.

DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.022

R. Hamasuna, M. Yasuda, K. Ishikawa, S. Uehara, H. Hayam S.Takahashi, T. Matsumoto, 他(46 名中 1 番目、6 番目、7 番目) The second nationwide surveillance of the antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* from male urethritis in Japan, 2012-2013 *Journal of Infection and Chemotherapy* . 査読あり 21: 2015, 340-345

DOI 10.1016/j.jiac.2015.01.010

R. Hamasuna, S. Takahashi, H. Nagae, T. Kubo, S. Yamamoto. S. Arakawa, T. Matsumoto. The obstructive pyelonephritis due to urolithiasis in Japan: diagnosis, treatment and prognosis. *International Journal of Urology*. 査読あり 22, 2015, 294-300.

doi: 10.1111/iju.12666

瀧砂良一、臨床に役立つ前立腺炎 慢性前立腺炎/慢性骨盤痛症候群、*Prostate Journal*、査読なし 2(1), 2015, 145-149

瀧砂良一、松本哲朗、大西真、耐性病原体 up-to-date ~ 耐性メカニズムから治療戦略まで ~ II耐性病原体 2グラム陰性菌 (6)セフトリアキソン耐性淋菌、化学療法の領域 査読なし 30 S-1: 2014、1005-1016

瀧砂良一、治療薬 淋菌感染症に対する治療薬 セフトリアキソン、感染症内科 査読なし 1(4): 2014、408-414

R. Hamasuna, Identification of treatment strategies for *Mycoplasma genitalium*-related urethritis in male

patients by culturing and antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 査読あり 19, : 2013. 1-11.

DOI: 10.1007/s10156-012-0487-3

R. Hamasuna, *Mycoplasma genitalium* in male urethritis-diagnosis and treatment in Japan. *International Journal of Urology*. 査読あり20: 2013, 676-684.

DOI:10.1111/iju.12152

瀧砂良一、II疾患・病態の診療 4. 尿路・生殖器の感染症 性感染症 淋菌感染症、泌尿器科診療 ベストNAVI 臨床泌尿器科 増刊号 査読なし 67(4): 2013、188-190

瀧砂良一、II疾患・病態の診療 4. 尿路・生殖器の感染症 性感染症 クラミジア感染症、泌尿器科診療 ベストNAVI 臨床泌尿器科 増刊号 査読なし 67(4): 2013、193-195

瀧砂良一、松本哲朗、村谷哲郎、新興・再興感染症 uo to date~Emerging and re-emerging infectious diseases~ I細菌感染症 12. 薬剤耐性淋菌、化学療法の領域 2013 増刊号 査読なし 29 (S-1): 2013、1007-1015

[学会発表](計 11 件)

R. Hamasuna, PT Le, M. Matsumoto, H. Fujimoto, T. Matsumoto. The detection of pathogens for non-gonococcal urethritis from the oral cavity of patients with male. Urethritis, 17th IUSTI World Congress, Marrakesh, Morocco, 2016/5/9-12

瀧砂良一、S T I 診断におけるマルチプレックスPCRの有用性、第28回 日本性感染症学会学術大、都市センターホテル(東京)、2015/12/5-6

R. Hamasuna, CL You, K. Fukuda, N. Fujimoto, T. Hachisuga, T. Matsumoto, H. Taniguchi, Analysis of bacterial flora of the urine specimens from male

patients with urethritis by the clone library method based on the 16S rRNA gene. 2015 World STI & HIV Congress and Australasian HIV&AIDS Conference, Brisbane, Australia, 2015/9/13-16

R. Hamasuna, Recent advancement in genitourinary tract infection /inflammation: Asian guideline on sexually transmitted diseases, 43rd General scientific meeting of the Taiwanese Association of Andrology, Taipei, Taiwan, 2015/3/7-8

R. Hamasuna, Symposium 9, Urogenital Infections; Risk factors for sexually transmitted Diseases, The 7th International Congress of the Asia Pacific Society of Infection Control, Taipei, Taiwan, 2015/3/26-29

R. Hamasuna, M. Yasuda, S. Takahashi, G. Lee, S. Gupta, Symposium 13, Asian Pacific : Regional guideline for management of STI: UAA/AAUS guideline preliminary recommendation for treatment of urethritis, 18th IUSTI Asian-Pacific Conferenc, Bangkok, Thailand, 2014/11/11-14

R. Hamasuna, T. Matsumoto, Symposium 14, Pharyngeal STI, Sexual behaviors and pharyngeal infection, 18th IUSTI Asian-Pacific Conference, Bangkok, Thailand, 2014/11/11-14

R.Hamasuna, New issues in adolescent Urology (II). "STIs in Japanese adolescents", 15rd Annual Congress od Asian-Pacific Association of Pediatric Urologists, Taipei, Taiwan, 2013/10/25-27

R.Hamasuna, Mycoplasma and ureaplasma infection, What new? Pathogenicity of Mycoplasma genitalium in men, 28th International Congress of Chemotherapy and Infection, パシフィコ横浜(Yokohama), Japan, 2013/6/5-8

R. Hamasuna, T. Sho, M. Matsumoto, M. Matsumoto, Antimicrobial activity of Sitafloxacin against fluoroquinolone-resistant Neisseria gonorrhoeae, 28th International Congress of Chemotherapy and Infection, パシフィコ横浜(Yokohama), Japan, 2013/6/5-8

R. Hamasuna, T. Sho, M. Matsumoto, M. Matsumoto, Unique activity of sitafloxacin, one of newer fluoroquinolones, against ciprofloxacin-resistant N. gonorrhoeae, STI &AIDS World Congress 2013, Viena, Austria, 2013/7/14-17

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松本 哲朗 (MATSUOTO, Tetsuro)
産業医科大学・医学部・名誉教授
研究者番号 : 50150420

(2)研究分担者

濱砂 良一 (HAMASUNA, Ryoichi)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 30189609

(3)連携研究者

高橋 聡 (TAKAHASHI, Satoshi)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 30332919

(3)連携研究者

福田 和正 (FUKUDA, Kazumasa)
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 40389424