

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11061

研究課題名(和文) 淋菌株の宿主応答における株間の多様性の検討

研究課題名(英文) Diversity of Neisseria gonorrhoeae strains in the host response

研究代表者

志牟田 健 (Shimuta, Ken)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：40370960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：淋菌感染症の原因菌である淋菌株個々の宿主に対する反応性の差異について検討を行った。同じ遺伝子型を持つ淋菌株を同一集団とし、本邦で近年分離された株より優先株として5つの系統を決定した。この系統間の違いについて確認を行った。いくつかの液体培養条件下での、菌株の増殖様式を調べたところ、BHI培地を用いた条件ではMLST7359の系統に属する菌株は他の集団に属する菌株とは異なるパターンを示した。培養細胞に対する細胞接着性、宿主細胞の炎症反応に影響を与えるLOSの発現パターンについて確認したところ、淋菌株間に差異が見られたが、系統に依存した差異は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の対象となる淋菌株の本邦における状況を明らかにするために、分離株の遺伝子型(MLST型)を決定した。その結果、短期間において流行株の変化が起きていることが分かった。適切な淋菌感染症における治療指針を策定するには、その時代に則したものが必要であり、そのためには対象となる分離株の最新の性状を把握することが重要であり、今回得られた情報はその策定を行う上で貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The differences of individual Neisseria gonorrhoeae strains about host response were examined. The same genotype, MLST, was set as the same group, and five groups were proposed as pre-dominant strains in Japan. I confirmed the differences between the groups. When the growth patterns of the strains were examined under some liquid culture conditions, the strains belonging to the MLST7359 showed a different pattern from the strains belonging to other lineage under the condition using BHI medium. The expression of thes LOS, which affects inflammatory of host response, and cell adhesion to cultured cells was confirmed, differences were observed between N. gonorrhoeae strains, but no lineages-dependent differences were observed.

研究分野：感染症

キーワード：性感染症 淋菌感染症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界では年間約 6300 万症例の淋菌感染症が報告されている。我々は 2010-2012 年に本邦で分離された淋菌 (n=193) の Multilocus sequence typing (MLST) 解析により、MLST1901、7363、7819、7359 の 4 系統に属する株で全体の 86% を占めることを報告している (文献 1)。現在、淋菌感染症治療薬で問題となっている第三世代セファロスポリン剤に対する非感受性株の多くが、先述の MLST 型 1901、7363、7819 の 3 つの系統に属する株に存在した。一方、興味深いことに MLST7359 系統に属する株では、ほとんどの治療薬剤に対して感受性を示した。ST7359 系統の株は少なくとも 10 年前の本邦分離株でも確認されている (文献 2)。系統依存的な特徴としては、薬剤感受性以外の表現系については今のところ、議論されていない。系統の違いに着目した淋菌株間のゲノム比較解析も行われていない。淋菌と一括りに議論されているが、全ての淋菌株が宿主に対して同様の反応性を示すのかについては、現在のところその答えはなく、そのような視点での研究は国内外で行われていない。これまでの淋菌感染症の主な研究では特定の実験室株のみで研究が行われており、個別の菌株間における比較検討解析は行われていない。

### 2. 研究の目的

個々の淋菌株が宿主に与える影響の違いについては、現在のところ多くの答えはない。一部の系統に属する菌株については、薬剤感受性の傾向の違いについて特徴があることが示されている (文献 1、2)。個々の菌株 (系統依存的な) の性質を明らかにすることは、淋菌感染症の真の理解に繋がることが期待される。本課題では MLST によって分類された淋菌株の系統を、同一の性状を示す集団とみなし、宿主細胞に対する反応性等の違いを系統間での比較解析することを試みた。特に、本邦で近年分離された系統間での宿主に与える影響の違いを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本邦で分離された淋菌株の分子系統解析は、MLST 法を用いた。分子系統解析に必要な各 allele 情報は illumina MiSeq システムを利用して得られた菌株のゲノムシーケンスから抽出した。菌株の培養条件を決定するために、GW 培地、gonococcus (GC) 培地、brain heart infusion (BHI) 培地、Luria-Bertani (LB) 培地を用いた淋菌の液体培養実験を行った。菌株の宿主細胞に与える反応性の差異を示す指標として、菌株の培養細胞に対する細胞接着性、宿主細胞の炎症反応に影響を与える LOS の発現パターンについて検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 対象菌株の選定

研究計画申請書における実験計画は、2010-2012 年における本邦での淋菌分離株状況 (文献 1) を基に作成された。これら株の MLST 解析により本邦における優先株は、MLST1901、7363、7819、7359 の 4 系統に属する株で全体の 86% を占めていた。よって、これら 4 系統の表現型の差異を比較検討することで、国内分離株での系統に依存した宿主細胞に対する反応性を示すことが可

能であると予想した。実験開始時に改めて最新（2015年分離）の、分離株の系統解析を行ったところ、先の優先株であった MLST1901、7363、7819、7359 の4系統では、86% → 44.2%へと大きく変化していた（文献3）。特に、MLST1901 の占める割合は、40.9% → 16.2%へと減少していた。一方、MLST1579 に属する株の割合は2.0%（2010-2012年）から12.7%（2015年）へと変化していた。更に本邦において2010-2012年では、確認されなかった MLST9362、MLST13840、MLST13841 に属する株が確認された（文献3）。これらの株は、2012年から2015年の間に、本邦で拡散したと考えられる。実験開始時には、MLST1579 を含めた5系統の占める割合は56.9%であった。よってこれら5系統（MLST1901、MLST7363、MLST7819、MLST7359、MLST1579）を優先株として、研究を開始した。

## (2) 菌株培養条件の確認

淋菌は、通常の一般細菌で使用される液体培地では生育困難であるため、淋菌の液体培養に適した培地の検討を行った。淋菌株の系統による増殖様式に差異があるのか検討した。上記5系統を2株、GW培地、gonococcus (GC)培地、brain heart infusion (BHI)培地、Luria-Bertani (LB)培地を用いた淋菌の培養実験を行った。5%炭酸ガス環境下、37℃、24時間の静置培養（5ml）を実施し、生菌数を調べることで各液体培地の評価を行った。その結果、GW培地を用いた時のみ、5系統とも同等の増殖曲線（CFU/ml）を示した。BHI培地を用いた培養試験ではMLST1579、1901、7363、7819の4系統と比較して7359のみが緩やかな増殖曲線（CFU/ml）を示すことがわかった。限られた条件下ではあるが、MLST7359に属する株の性状の一つを示すことが出来た。更に各系統の菌培養液（GW培地）における分光吸光度測定による濁度（OD<sub>600</sub>）と生菌数の相関を調べたところ、OD<sub>600</sub> = 0.4 は平均して  $1.0 \times 10^8$  cfu/ml となることを明らかとした。分光吸光度測定による濁度と液体培養菌液の生菌数との相関を示すことができ、各実験開始時における各菌株の生菌数を統一することを可能とした。

## (3) 細胞接着性の確認

MLSTにおいて分子系統分類された MLST1901、MLST7363、MLST7819、MLST7359、MLST1579 の5系統に属する菌株による培養細胞を用いた感染実験（MOI=10、90min）において、培養細胞に接着した菌数をカウントした。培養細胞に対する細胞接着性については、淋菌株間に差異が見られた。しかし、系統に依存した差異は見られなかった。

## (4) LOS (lipooligosaccharide) の発現パターンの確認

宿主細胞の炎症反応に影響を与える LOS (lipooligosaccharide) の発現パターンについて上記の MLST1901、MLST7363、MLST7819、MLST7359、MLST1579 の合計5系統の株について調べた。LOSの抽出はホットフェノール水抽出法にて行った。SDS-PAGEによる展開後、銀染色を行った。その結果、淋菌株間においてその発現パターンに若干の差異が見られたが、系統に依存した差異は認められなかった。

## (5) 今後の展望など

本課題では、菌株の系統間での宿主に対する反応性の違いを確認することを目的としたが、明らかな宿主応答に影響を及ぼす差異を示すには至らなかったが、個々の菌株間による性状の違いが存在することが明らかとなった。本研究計画は、2010-2012年における本邦での淋菌株の分離状況（文献1）を基に作成された。これら株のMLST解析による本邦における優先株は、MLST1901、7363、7819、7359の4系統に属する株で全体の86%を占め、これら株間の違いを比較検討することで株間における宿主に対する反応性の差異が明らかになると予想した。研究計画時には、短期間での優先株の大幅な変化を伴わない前提で実験計画であったが、実験開始時に2015年時（n=204）におけるMLST1901、7363、7819、7359の4系統における占有率が、86% 44.2%へと大きく変化したことを明らかとした（文献3）。更なる調査において2016年（n=125）= 36%、2017年（n=170）= 33.5%に変化したことも合わせて明らかとなった。数年の期間において大幅な優先株の変化が生じることは、研究計画時には想定していなかったが、新たな知見となった。今回見られた短期間における国内分離株における優先株の変化の理由は分からない。海外の調査においても、同一地域における淋菌分離株における短期間における優先株の変化を示したものは見られない。今後、この現象が本邦特有な現象なのか、他の地域との比較検討が必要である。また今回見られた短期間における優先株の変化について、淋菌株の宿主に対する反応性の変化を伴うものであるのかについて、考察することも重要と考えられる。

#### <引用文献>

Shimuta K, Unemo M, Nakayama S, et al. Antimicrobial resistance and molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Kyoto and Osaka, Japan, 2010 to 2012: Intensified surveillance after identification of the first strain (H041) with high-level ceftriaxone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:5225-32

Shimuta K, Watanabe Y, Nakayama S, et al. Emergence and evolution of internationally disseminated cephalosporin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* clones from 1995 to 2005 in Japan. *BMC Infect Dis.* 2015.17;15:378.

Yahara K, Nakayama SI, Shimuta K, et al. Genomic surveillance of *Neisseria gonorrhoeae* to investigate the distribution and evolution of antimicrobial resistance determinants and lineages. *Microb Genom* 2018; 4: e000205.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yahara Koji, Nakayama Shu-ichi, Shimuta Ken, Lee Ken-ichi, Morita Masatomo, Kawahata Takuya, Kuroki Toshiro, Watanabe Yuko, Ohya Hitomi, Yasuda Mitsuru, Deguchi Takashi, Didelot Xavier, Ohnishi Makoto	4. 巻 4
2. 論文標題 Genomic surveillance of <i>Neisseria gonorrhoeae</i> to investigate the distribution and evolution of antimicrobial-resistance determinants and lineages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbial Genomics	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/mgen.0.000205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimuta K, Igawa G, Yasuda M, Deguchi T, Nakayama SI, Ohnishi M.	4. 巻 19
2. 論文標題 A Real-Time PCR Assay for the Detection of a <i>penA</i> Mutation Associated with Ceftriaxone Resistance in <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Glob Antimicrob Resist	6. 最初と最後の頁 46-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jgar.2019.02.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Igawa G, Yamagishi Y, Lee KI, Dorin M, Shimuta K, Suematsu H, Nakayama SI, Mikamo H, Unemo M, Ohnishi M	4. 巻 62
2. 論文標題 <i>Neisseria cinerea</i> with High Ceftriaxone MIC Is a Source of Ceftriaxone and Cefixime Resistance-Mediating <i>penA</i> Sequences in <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Antimicrob Agents Chemother	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.02069-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Deguchi T, Ito S, Hatazaki K, Horie K, Yasuda M, Nakane K, Mizutani K, Tsuchiya T, Yokoi S, Hanaoka N, Shimuta K, Ohnishi M, Muratani T, Nakano M	4. 巻 23
2. 論文標題 Antimicrobial susceptibility of <i>Haemophilus influenzae</i> strains isolated from the urethra of men with acute urethritis and/or epididymitis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 804-807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2017.05.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwata A, Shimuta K, Ohnishi M	4. 巻 56
2. 論文標題 Conjunctivitis Caused by a Strain of Neisseria gonorrhoeae That Was Less Susceptible to Ceftriaxone.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 1443-1445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.56.7656	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito S, Hatazaki K, Shimuta K, Kondo H, Mizutani K, Yasuda M, Nakane K, Tsuchiya T, Yokoi S, Nakano M, Ohnishi M, Deguchi T	4. 巻 44
2. 論文標題 Haemophilus influenzae Isolated From Men With Acute Urethritis: Its Pathogenic Roles, Responses to Antimicrobial Chemotherapies, and Antimicrobial Susceptibilities.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sex Transm Dis	6. 最初と最後の頁 205-210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/OLQ.0000000000000573	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama SI, Shimuta K, Furubayashi KI, Kawahata T, Unemo M, Ohnishi M	4. 巻 60
2. 論文標題 New ceftriaxone- and multidrug-resistant Neisseria gonorrhoeae strain with a novel mosaic penA gene isolated in Japan	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Antimicrob Agents Chemother	6. 最初と最後の頁 4339-4341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.00504-16	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimuta K, Nakayama SI, Takahashi H, Ohnishi M.	4. 巻 64
2. 論文標題 A Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay Targeting Neisseria gonorrhoeae penA-60.001	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrob Agents Chemother	6. 最初と最後の頁 se01663-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.01663-19	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 金坂伊須萌、山根夏枝、伊與田貴子、天野綾子、小山英明、松本 哲、勝瀬（金山） 明子、志牟田健、大西 真、小林寅詰
2. 発表標題 CTRX耐性N. gonorrhoeaeおよびCTRX低感受性N. subflavaに対するpenA遺伝子解析
3. 学会等名 日本性感染症学会第31回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安田満、志牟田健、中山周一、小林寅詰、大澤佳代、陳内理生、三宅啓文、瀧砂良一、荒川創一、大西 真
2. 発表標題 2015～2017年にわが国で分離された淋菌の薬剤感受性報告
3. 学会等名 日本性感染症学会第31回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 志牟田 健、井川ジーン、中山周一、大西 真
2. 発表標題 セフトリアキソン耐性淋菌特異的リアルタイムPCR系の構築
3. 学会等名 日本性感染症学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川畑拓也、古林敬一、亀岡 博、安本亮二、中山周一、志牟田健、大西 真
2. 発表標題 大阪府内において分離された淋菌株の薬剤感受性率の推移と多剤耐性の傾向
3. 学会等名 日本性感染症学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 志牟田 健
2. 発表標題 種を超えた遺伝子伝播 耐性遺伝子プールの存在
3. 学会等名 第66回日本感染症学会東日本地方学術集会、第64回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ken Shimuta, Shu-ichi Nakayama, Tomoko Morita-Ishihara, Makoto Ohnishi
2. 発表標題 Characterization of azithromycin resistant Neisseria gonorrhoeae strains isolated in Kyoto and Osaka, Japan, 2010-2015
3. 学会等名 19th IUSTI Asia-Pacific Conference（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 安田満、志牟田健、中山周一、小林真詰、大澤佳代、陣内理生、三宅啓文、浜砂良一、荒川創一、大西真
2. 発表標題 2018年にわが国で分離された淋菌の薬剤感受性報告
3. 学会等名 日本性感染症学会 第32回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志牟田 健、中山周一、高橋英之、大 西 真
2. 発表標題 淋菌pneA 60.001遺伝子のLAMP法による検出
3. 学会等名 日本性感染症学会 第32回学術大会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 志牟田 健
2. 発表標題 SNPタイピングによるセフトリアキソン耐性淋菌株の保持するpenA 遺伝子のLAMP法による検出
3. 学会等名 第12回LAMP研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----