

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11193

研究課題名（和文）多剤耐性マイコプラズマ・ジェニタリウムの検出と治療に関する検討

研究課題名（英文）Study for detection and treatment of multidrug-resistant *Mycoplasma genitalium*

研究代表者

濱砂 良一（HAMASUNA, Ryoichi）

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：30189609

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：日本人の非淋菌性尿道炎患者の尿より、13株の*M. genitalium*株を分離培養した。13株に標準株G37を1株と2003年分離の4株を加えた計18株を対象に検討を行った。マクロライド耐性は12株であり、23S rRNAのMRAMを有していた。MFLXのMICが1 mg/L以上の株が9株であった。ParC、GyrAのQRDRのシークエンスでは、MFLX耐性株ではすべてParCで83Ser Ileに変異していた。83Ser Asnに変異した3株ではキノロン耐性ではなかった。TMA法による*M. genitalium*検出の感度を測定し、0.03-0.87 DNAコピーが検出限界であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

*Mycoplasma genitalium*は男性尿道炎、子宮頸管炎の原因微生物である。近年、薬剤耐性が進行しており、クラミジア感染症と同じ抗菌薬で治療困難例が増加している。本研究では、*M. genitalium*の分離培養法を行い、新しい株の薬剤耐性、遺伝子変異の研究を行った。13株を分離し、うち12株がマクロライド耐性、9株がキノロン耐性であった。キノロン耐性はParCのキノロン耐性決定領域のシークエンスを行い、83番のSerineがisoleucineへのアミノ酸変異を含む遺伝子変異が牽連があることを見出した。

研究成果の概要（英文）：From Japanese patients with non-gonococcal urethritis, new 13 *Mycoplasma genitalium* strains were isolated and cultured. We analyzed antimicrobial susceptibility and genome mutations of total 18 strains including 13 new isolates, type strain and 4 strains isolated at 2014. Among these strains, 12 strains were macrolide-resistant and had MRAM on 23S rRNA gene. In addition, 9 strains had MIC with more than 1 mg/ml against moxifloxacin (MFLX). By sequence of QRDR of ParC, strains with more than 1 mg/L MIC of MFLX had mutation with amino-acid change such as Ser83 Ile, but strains with mutation such as Ser83 Asn did not elevate MIC of MFLX. To know the sensitivity of transcription-mediated amplification (TMA) method, the detection limit was measured among 20 stocked *M. genitalium* strains. The detection limit of TMA method were 0.03-0.87 DNA copies.

研究分野：性感染症

キーワード：mycoplasma genitalium 尿道炎 マクロライド耐性 キノロン耐性 moxifloxacin 耐性 parC TMA

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Mycoplasma genitalium は 1981 年の Tully らにより報告されたマイコプラズマであり、数々の研究により男性尿道炎、女性子宮頸管炎、骨盤内臓器感染症に対する病原性が確立している。しかし、我が国では *M. genitalium* 感染症の診断や検出法に対する保険適用がないため、我が国で適切に検査、治療が行われているとは言い難い。近年 *M. genitalium* の薬剤耐性が急増しているため、その治療法はさらに難しくなっていると言ってよい。*M. genitalium* の検査が行われない状態で非淋菌性尿道炎を治療する場合、クラミジア性尿道炎に準じて治療を行ってきた。我が国のガイドライン(日本性感染症学会 診断治療ガイドライン 2016)では、マクロライド、テトラサイクリン、ニューキノロンによる治療が推奨されてきた。しかし、*M. genitalium* はもともとテトラサイクリンに対して低感受性である上に、マクロライド耐性の割合が劇的に増加し、世界的には 50%を超えていると報告され、我が国では 70%に達している (Deguchi, J Infect Chemother, 2019)。また、近年ではニューキノロン耐性、特に *M. genitalium* に抗菌力が強い sitafloxacin (STFX) や moxifloxacin (MFLX) に対する耐性が問題となっている (Couldwell, Int J STD AIDS 2013, Jensen Antimicrob Agent Chemother 2014)。

M. genitalium に対する研究で最も障害となるのは、*M. genitalium* の分離培養が困難であることであり、現時点においても臨床検体からの *M. genitalium* の分離培養は、我が国では我々のグループ以外では不可能である。加えて薬剤感受性試験はさらに困難である。液体培地の増殖する株の分離には極めて時間がかかるため、細胞培養上で増殖する株を用いた cell-culture 法を開発した(Hamasuna, Antimicrob Agent Chemother, 2006)。これらの技術を用いて、我々は、我が国で初めてマクロライド耐性株を分離し、さらに、キノロンにも耐性である多剤耐性株の分離培養に成功した。これらの株の分離の報告および耐性遺伝子の検討は、本研究の一部として報告している。このなかで我々は、マクロライド耐性がマクロライド耐性関連遺伝子 (macrolide-resistance associated mutation: MRAM) の有無と関連があることを、我が国の分離株で確認した。さらに、我が国で初めて見出したキノロン耐性株における遺伝子変異に関する検討を開始してきたが、いまだにキノロン耐性遺伝子は明らかとなっていない。

M. genitalium を検出する検査法に関しては、我が国では他の 3 種類のマイコプラズマを同時に検出する multiplex PCR が開発されている。しかし、海外においては、*M. genitalium* のみを検出する PCR 法が開発されており(Kirkconnell, J Clin Microbiol 2019)、我が国でもその導入が期待されている。

2. 研究の目的

M. genitalium を臨床検体から分離培養できる我が国唯一の研究室として、男性尿道炎の尿沈渣より *M. genitalium* を分離している(Hamasuna, J Clin Microbiol, 2009)。さらに、細胞培養を使用した薬剤感受性法(Hamasuna, Antimicrob Agent Chemother, 2006)を行っている、これらの技術より臨床分離株とその薬剤感受性を測定し、薬剤耐性 *M. genitalium* 株をより多く分離することを大きな目的とした。多くの耐性株を解析することにより、ニューキノロン耐性を含む薬剤耐性メカニズムを明らかにできることとなる。さらに、もう一つの目的は、*M. genitalium* を検出するキット製品の精度、感度を明らかにすることである。本研究では 1 検査キットを用いて、その検査キットの感度を測定する。

3. 研究の方法

(1) 薬剤耐性 *M. genitalium* 株の分離培養

Website (<https://www.uoeh-u.ac.jp/kouza/hinyo/notice02.html>) 上においての非淋菌性尿

道炎の原因微生物の検出を希望する施設より尿検体を採取し、その中で *M. genitalium* 陽性検体より *M. genitalium* 株を分離した。さらに、分離した株のマクロライド、テトラサイクリン、ニューキノロン薬に対する薬剤感受性を cell-culture 法にて最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) 測定した。対象となる抗菌薬は azithromycin (AZM)、clarithromycin (CAM)、doxycycline (DOXY)、minocycline (MINO)、ciprofloxacin (CPFX)、levofloxacin (LVFX)、STFX、MFLX である。本研究は産業医科大学倫理委員会承認番号 H29-103 にて承認された。

(2) *M. genitalium* のキノロン耐性のメカニズムを検討

M. genitalium のキノロン耐性のメカニズムを検討するため、*gyrA*、*parC* 遺伝子におけるキノロン耐性決定領域 (quinolone-resistance determining region: QRDR) のシーケンスを行った。さらに、キノロン薬の特に QRDR 部分を中心とした結晶構造を決定し、STFX、MFLX 耐性のメカニズムを検討した。

(3) transcription-mediated amplification (TMA) 法による *M. genitalium* の検出の感度決定

TMA 法による *M. genitalium* の検出の感度を測定するため、我々が保存している 20 株の *M. genitalium* 株を用いて、希釈系列を作成し、real-time PCR 法による DNA コピー数と TMA 法による rRNA 測定法を比較し、TMA 法の感度を測定した。real-time PCR 法は *MgPa* 遺伝子の一部を、TMA 法は 16S rRNA 遺伝子の一部を増幅する方法にて *M. genitalium* を検出した。-80℃ で冷凍保存した *M. genitalium* 株を SP4 mycoplasma で希釈し、10 倍希釈列を作成した。10³ ~ 10⁷ まで希釈列をそれぞれ、real-time PCR 法と TMA 法とで測定し、TMA 法で陽性となった最大希釈した検体の DNA コピー数を推定し、感度とした。

4. 研究成果

(1) 新しい *M. genitalium* 株の分離と薬剤感受性

2017 年より、我が国の医療施設で採取した尿検体より、13 株の *M. genitalium* 株を分離、培養した。これらの 13 株および標準株 G37、2003 年の分離した 4 株を加えた 18 株を対象に検討を行った。マクロライド耐性株は 12 株であり、この 12 株に対する AZM、CAM の MIC は 16mg/L 以上で、すべて 23S rRNA 遺伝子に MRAM を有していた。

一方、ニューキノロンの薬剤感受性は、抗菌薬によって異なっていた。18 株中、CPFX、LVFX の MIC が 1 mg/L 以上であったがそれぞれ 18 株、17 株であった。STFX、MFLX に対しては、MIC が 1 mg/L 以上であった株がそれぞれ 3 株、9 株であった。これらの株の *gyrA*、*parC* 遺伝子の QRDR のシーケンス結果をもとに、アミノ酸変異を来した遺伝子変異を検討した(表 1)。MFLX の MIC を基準に比較すると、MFLX の MIC が 1 mg/L 以上の株ではすべて ParC の 83 番の Serine (Ser) が Isoleucine (Ile) に変異していた (Ser83 Ile)。同じ、83 番の Serine が Asparagine (Asn) に変異した 3 株の MFLX の MIC は上昇しおらず、ParC では Ser83 Ile の変異が最も重要であり、同アミノ酸が Asn に変異しても MFLX 耐性とはならないことが判明した。

一方、GyrA の変異は 3 種類のアミノ酸変異が確認された (Gly93 Cys、Met95 Ile、Asp99

Asn)。MFLX の MIC が 2 以上の株では、これらの GyrA の変異が複数、または単独の変異が認められたが、MIC との関連は明らかにはならなかった。

表 1 MFLX に対する MIC と ParC と GyrA における QRDR のアミノ酸変異を伴う遺伝子変異

MFLX の MIC	n	ParC における変異	GyrA における変異
16	2	Ser83→Ile	Asp99→Asn Met95→Ile, Asp99→Asn
8	1	Ser83→Ile	Met95→Ile, Asp99→Asn
4	1	Ser83→Ile	Met95→Ile
	1		Gly93→Cys
2	3	Ser83→Ile	Met95→Ile
1	2	Ser83→Ile	なし
0.5	1	Asp87→Tyr	なし
0.25	2	Ser83→Asn	なし
	1	なし	
0.13	1	Ser83→Asn	なし
	1	Ala69→Thr	
≤0.06	3	なし	なし

(2) *M. genitalium* の ParC および GyrA の QRDR の結晶構造との関連

M. genitalium の DNA gyrase および topoisomerase IV の結晶構造は決定していないため、すでに構造が公開されている構造をもとに作成し、STFX と MFLX の骨格をあてはめ結合部位を検討した。GyrA、ParC とともにニューキノロン骨格の結合モードは共通であり、R1 は GyrB もしくは ParE 近傍に、R3 は GyrA もしくは ParC 近傍に位置した。GyrA 側では Met95、Asn99、Gly93 と結合し、ParC 側では Ser83、Asn86、Asp119 との結合の可能性が高く、表 2 で示した変異部位は、キノロン骨格との結合部位に近いところであることは判明した。従って、今後 *M. genitalium* のニューキノロン耐性はさらに進む可能性が示唆された。Ser83 Ile および Ser83 Asn の変異に関しては、Ile が脂溶性であり Asn が親水性であることが MIC の差となっている可能性が示唆された。また、STFX と MFLX との間に結晶構造上の差は認められなかった。

(3) TMA 法における *M. genitalium* 検出の感度の検討

保存している *M. genitalium* 20 株を用い、TMA 法で陽性となった最大希釈検体中の DNA コピー数を示した (表 3)。TMA 法の感度は 0.03-0.87 genome equivalence(geq)/ml であった。Real-time PCR 法ではおおよそ 10 geq/ml を感度の限界としており、TMA 法はおおよそ 100 倍の感度があると考えられる。しかし、TMA 法陽性症例と症状の関連は明らかではなく、また抗菌薬による治療判定について臨床研究を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hamasuna R., Le PY, Kutsuna S, Furubayashi K, Matsumoto M, Ohmagari N, Fujimoto N, Matsumoto T, Jensen JS	4. 巻 13
2. 論文標題 Mutations in ParC and GyrA of moxifloxacin resistant and susceptible Mycoplasma genitalium strains	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plos One	6. 最初と最後の頁 e0198355.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0198355. eCollection 2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 濱砂良一	4. 巻 267
2. 論文標題 性感染症UPDATA. マイコプラズマ・ジェニタリウムの薬剤耐性化	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 211-217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 濱砂良一・松本正広・松本哲朗	4. 巻 727
2. 論文標題 北九州地区における性感染症の発生動向調査	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 北九州市医報	6. 最初と最後の頁 34-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 濱砂良一	4. 巻 72
2. 論文標題 特集 何が変わったのか? 性感染症の動向 性感染症を診療する 性器外性感染症	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床泌尿科	6. 最初と最後の頁 1000-1004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 濱砂良一	4. 巻 22
2. 論文標題 性器クラミジア感染症・非クラミジア性非淋菌性尿道炎	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 泌尿器Care & Cure UR0-Lo	6. 最初と最後の頁 79-84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 濱砂良一	4. 巻 72
2. 論文標題 婦人科感染症の診断・管理 その秘訣とピットフォール 性感染症 淋菌感染症の基礎と臨床	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床婦人科産科	6. 最初と最後の頁 25-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 濱砂良一	4. 巻 146
2. 論文標題 特集 性感染症 今、何が問題か マイコプラズマ・ジェニタリウム感染症の診断と治療	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本医師会雑誌	6. 最初と最後の頁 2489-2492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 濱砂 良一, 松本 正広, レ ティ ファン, 藤本 直浩, 松本 哲朗	4. 巻 40
2. 論文標題 男子尿道炎からのMycoplasma genitalium検出のためのキットの検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of UOEH	6. 最初と最後の頁 45-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 濱砂良一	4. 巻 66
2. 論文標題 非淋菌性尿道炎の第一選択に何を選擇すべきか	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本化学療法学会雑誌	6. 最初と最後の頁 173-184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 濱砂良一	4. 巻 22
2. 論文標題 外来における性感染症の基本と実践 淋菌感染症	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 感染と抗菌薬	6. 最初と最後の頁 1930199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 濱砂良一	4. 巻 46
2. 論文標題 高齢者における感染症－病態、診断、治療および予防 高齢者における臓器別感染症 尿路・生殖器感染症	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床と微生物	6. 最初と最後の頁 055-061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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16件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Ryoichi Hamasuna, Masahiro Matsumoto, Naohiro Fujimoto, Tetsuro Matsumoto
2. 発表標題 Culture-based analysis of antimicrobial resistance among Mycoplasma genitalium strains in Japan
3. 学会等名 IUSTI Sexual Health Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀧砂良一, 松本正広, 藤本直浩
2. 発表標題 日本由来Mycoplasma genitalium株の薬剤感受性と遺伝子変異の関係
3. 学会等名 第31回 日本性感染症学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀧砂良一
2. 発表標題 教育企画「性感染症の最新トピックー薬剤耐性」 非淋菌性尿道炎の治療方針
3. 学会等名 第106回 日本泌尿器科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀧砂良一
2. 発表標題 ワークショップ3 耐性菌による市中感染にどう対峙するか
3. 学会等名 第92回日本感染症学会学術講演会 第66回日本化学療法学会総会 合同学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀧砂良一、忽那賢志、松本正広、藤本直浩、松本哲朗
2. 発表標題 Sitafloxacinによる治療失敗例から分離培養したMycoplasma genitalium株とその薬剤感受性
3. 学会等名 日本性感染症学会 第30回学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 瀨砂良一
2. 発表標題 性感染症治療におけるUp to date 非淋菌性尿道炎の第一選択薬に何を選択すべきか
3. 学会等名 第91回日本感染症学会総会 学術講演会 第65回日本化学療法学会学術集会 合同学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 瀨砂良一
2. 発表標題 尿路感染症・性感染症 ゴールドスタンダードを考えるー 尿道炎の治療 ゴールドスタンダードとは？
3. 学会等名 第105回日本泌尿器科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryoichi Hamasuna, Masahiro Matsumoto, Naohiro Fujimoto, Tetsuro Matsumoto
2. 発表標題 Antimicrobial susceptibility data of Mycoplasma genitalium strains isolated in Japan
3. 学会等名 STI&HIV 2019 World Congress, joint meeting of the 23rd ISSTD & 20th IUSTI (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryoichi Hamasuna, Masahiro Matsumoto, Naohiro Fujimoto
2. 発表標題 Fluoroquinolone-resistant Mycoplasma genitalium strains isolated from urine specimens of Japanese male patients: culture-based analysis
3. 学会等名 International Union against STI Asian-Pacific Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧砂良一
2. 発表標題 合同シンポジウム3 性感染症制御学の確立を目指して～現状を知り、問題点を抽出する マイコプラズマ・ジェニタリウムの現状と問題点 新たな治療法開発の試み
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧砂良一
2. 発表標題 シンポジウム9 STIに関する最近の知見ー男性尿道炎に対する治療ガイドラインよりー
3. 学会等名 第57回日本化学療法学会西日本支部総会、第89回日本感染症学会西日本地方会学術集会、第62回日本感染症学会中日本地方会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧砂良一
2. 発表標題 シンポジウム1 「今更聞けない性感染症」マイコプラズマ・ジェニタリウム
3. 学会等名 日本性感染症学会 第32回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧砂良一
2. 発表標題 教育企画3 性感染症～標準診断・治療法を確認し、感染症を制御しよう～クラミジア性尿道炎・非クラミジア性非淋菌性尿道炎
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧砂良一
2. 発表標題 会長講演 尿道炎および子宮頸管炎の原因微生物としてのChlamydia trachomatisとMycoplasma genitalium
3. 学会等名 第37回日本クラミジア研究会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧砂良一
2. 発表標題 ランチョンセミナー8 「非淋菌性尿道炎：診断と治療最新動向^マイコプラズマ・ジェニタリウム検出キットの検討」
3. 学会等名 日本性感染症学会 第32回学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧砂良一
2. 発表標題 性感染症としてのmycoplasma genitalium - 培養と薬剤耐性
3. 学会等名 第10回東海STI研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 性感染症 3 性器クラミジアかんせんしょう	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 2
3. 書名 感染症 最新の治療2019-2021	

〔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
研究 分 担 者	松本 正広 (Matsumoto Masahiro) (20580294)	産業医科大学・医学部・助教 (37116)	