

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462509

研究課題名(和文) 男子尿道炎における病原体抗菌薬耐性サーベイランスの構築

研究課題名(英文) Surveillance of antimicrobial susceptibility of pathogens of male urethritis

研究代表者

出口 隆 (Deguchi, Takaashi)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40163935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： 男子尿道炎の起炎菌である淋菌と *Mycoplasma genitalium* の抗菌薬感受性について検討した。淋菌については、セフィキシム低感受性株、キノロン耐性株、アジスロマシム耐性株の出現を認めるも、セフトリアキソンに対しては感受性を維持していた。しかし、2014年にセフトリアキソン低感受性株、GU140106を見出した。*M. genitalium* については、マクロライド耐性とキノロン耐性に関わる遺伝子変異が検出され、さらに、両者を同時に有するものも検出され、*M. genitalium* の多剤耐性化が示唆された。引き続き、これら細菌の薬剤感受性を継続的に注視する必要があるものと思われた。

研究成果の概要(英文)： We examined clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* for antimicrobial susceptibility and *Mycoplasma genitalium* DNAs for macrolide and quinolone resistance-associated mutations. We observed some isolates with decreased susceptibility to cefixime, with resistance to levofloxacin, and with resistance to azithromycin. We isolated a strain (GU140106) with decreased to ceftriaxone in 2014 but found that all other isolates were susceptible to ceftriaxone. We detected macrolide resistance-associated and/or quinolone resistance-associated mutations in *M. genitalium* DNAs. The presence of *M. genitalium* DNAs harboring both mutations suggested that some strains of *M. genitalium* might be evolving into multi-drug resistant ones. We should continue to pay attention to the antimicrobial susceptibility of these pathogens.

研究分野：感染症学

キーワード： *Neisseria gonorrhoeae* *Mycoplasma genitalium* 薬剤耐性 性感染症 尿道炎

## 1. 研究開始当初の背景

男子尿道炎の主な起炎菌は、淋菌、*Chlamydia trachomatis*、*Mycoplasma genitalium*、*Ureaplasma urealyticum*である。日本における淋菌の各種抗菌薬に対する耐性化は、欧米に比較して著しい。2009年に京都でセフトリアキソンによる治療失敗例が報告され、その症例よりセフトリアキソン耐性淋菌が分離された。その出現は、“superbug”や“untreatable gonorrhea”などと報告されて、世界的に話題となった。それ以後、日本ではセフトリアキソン耐性淋菌の報告はないが、海外にて耐性、低感受性の淋菌が分離されていなかったが、その出現と拡大が危惧されていた。また、*M. genitalium*のマクロライド耐性やキノロン耐性に関わる遺伝子変異が日本においても報告され始めていた。しかし、日本におけるこれら起炎菌薬剤感受性のサーベイランスは、完備されていなかった。このことが、日本における淋菌やその他病原体の薬剤耐性化とその拡大の原因の1つであると考えられていた。

## 2. 研究の目的

男子尿道炎の主な起炎菌である淋菌、*C. trachomatis*、*M. genitalium*、*Ureaplasma* spp. の4菌種の薬剤耐性化を経時的に追跡し、新たな高度耐性菌の出現を早期に検知し、その拡大を防ぐことと、その結果に基づいた適正化学療法を提案することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 淋菌臨床臨床分離株での検討

淋菌臨床分離株の収集のための既に構築しているネットワークに含まれる岐阜大学医学部附属病院および岐阜県、愛知県、静岡県、宮城県、埼玉県内の協力参加医療機関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菌株を収集した。さらに、京都市のcommercial sex worker (CSW)からの検体採取が可能な施設との共同研究を開始した。細菌検査室で分離、同定された淋菌を保存用培地

に入れ、岐阜大学大学院医学系研究科泌尿器科学分野の研究室に輸送し、-70°Cのフリーザー内で保存した。

保存されていた淋菌臨床分離菌株を改めて淋菌であることの確認検査を実施した後に、淋菌臨床分離株に対するレボフロキサシン (LVFX)、セフィキシム (CFIX)、セフトリアキソン (CTRX)、アジスロマイシン (AZM)およびスペクチノマイシン (SPCM)の最小発育阻止濃度 (MIC) を Clinical Laboratory Standards Institute の方法に準じて測定した。

CTRX 低感受性淋菌については、ペニシリン結合蛋白2をコードする *penA* 遺伝子の変異、特に *Neisseria cinerea* と *Neisseria perflava* の *penA* 遺伝子の一部からなるモザイク様の *penA* 遺伝子がセファロスポリン薬の感受性の低下に有意に関連することが判明している。そのため、淋菌臨床分離株におけるモザイク様の *penA* 遺伝子の有無を検索する。さらに、porin の遺伝子と関連し抗菌剤の膜透過性に関与する *penB* 遺伝子および  $\beta$ -lactam による acylation の低下に関する *ponA1* 遺伝子の変異を新たに検索した。

耐性菌については、国際的な比較が可能な *por* 遺伝子と *tbpB* 遺伝子の変化に基づく *N. gonorrhoeae* multiantigen sequence typing (NG-MAST) と multilocus sequence typing (MLST) を実施した。

### (2) 男子尿道炎患者の初尿中 *M. genitalium* DNA および *Ureaplasma* spp. DNA での検討

岐阜大学医学部附属病院および岐阜県、愛知県、静岡県、宮城県、埼玉県内の協力参加医療機関を受診した尿道炎患者の初尿中の細菌 DNA を収集した。初尿より DNA を抽出し、岐阜大学大学院医学系研究科泌尿器科学分野の研究室において、-70°C のフリーザー内で保存した。

23S rRNA の domain II および V におけるの

変異を検索した。23S rRNA 遺伝子を PCR 法により増幅し塩基配列を決定した。

キノロン耐性菌については、*gyrA* および *parC* 遺伝子の変異を検索した。各遺伝子のキノロン耐性決定領域を PCR 法により遺伝増幅し塩基配列を決定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 淋菌臨床分離株の薬剤感受性

2013 年の 214 株、2014 年の 192 株と 2015 年の 239 株に対する淋菌感染症の治療薬としてガイドラインにて推奨されてきた主たる薬剤である CFIX、CTRX、AZM および LVFX の MIC を示す。

Year	MIC (mg/L) of CFIX		
	Range	50%	90%
2013	<0.001-1	0.125	0.5
2014	0.004-2	0.125	0.5
2015	<0.001-1	0.06	0.5

表 1 淋菌臨床分離株に対する CFIX の MIC

この 3 年間に於いて淋菌臨床分離株に対する CFIX の MIC の変化は認められなかった(表 1)。CFIX 低感受性菌の出現により、CFIX による淋菌治療は推奨されていない。

Year	MIC (mg/L) of CTRX		
	Range	50%	90%
2013	0.002-0.25	0.06	0.125
2014	<0.001-0.5	0.03	0.125
2015	<0.001-0.5	0.03	0.25

表 2 淋菌臨床分離株に対する CTRX の MIC

この 3 年間に於いて淋菌臨床分離株に対する CTRX の MIC の変化は認められなかった(表 2)。しかし、2014 年に分離された淋菌の中で、CTFX 低感受性株 (MIC 0.5 mg/L)、

GU140106 を見出した。GU140106 のペニシリン結合蛋白 2 の変異は、京都で分離された高度耐性菌である H041 とオーストラリアで分離された低感受性菌である A8806 のペニシリン結合蛋白 2 の変異と類似していた。さらに、遺伝子型の MLST で同一の ST7363 を有していた。このことは、セフトリアキソン耐性、低感受性淋菌の日本での出現と東アジア、オセアニアへの拡大の予兆と考えられた。

Year	MIC (mg/L) of AZM		
	Range	50%	90%
2013	0.015-32	0.5	1
2014	0.03-16	0.5	1
2015	0.06-16	0.5	1

表 3 淋菌臨床分離株に対する AZM の MIC

イギリスをはじめ海外では、AZM 高度耐性淋菌の出現がすでに報告されている。しかし、日本では高度耐性淋菌の出現は報告されていない。今回の検討にても高度耐性菌は認められなかった(表 3)。2009 年に淋菌性尿道炎を含む淋菌感染症に対して AZM-SR 2g 単回投与による内服治療の保険適用が認められた。われわれの検討では、AZM の MIC が 1 mg/L 以上の菌株で AZM-SR 2g 単回投与の失敗例を経験している。現在、AZM の MIC90 は、1 mg/L であるが、MIC のより高値を示す菌株の出現もみられることから、今後も AZM に対する感受性の変化を注視する必要がある。

Year	MIC (mg/L) of LVFX		
	Range	50%	90%
2013	0.008-32	8	8
2014	0.008-16	4	8
2015	0.008-32	8	16

表 4 淋菌臨床分離株に対する LVFX の MIC

ニューキノロン系薬に対する耐性淋菌の割合は、80%から 90%で非常に高い。現在、ニューキノロン薬は、淋菌感染症の治療薬とし

て推奨されておらず、使用頻度は減少していることが予想されるが、感受性への移行は認められていない。

SPCM に対しては、すべての淋菌臨床分離株は感受性を示した。現時点で、SPCM 耐性淋菌を検出していない。

(2) *M. genitalium* の薬剤耐性関連の遺伝子変異

マクロライド耐性に関わる 23S rRNA 遺伝子の変異とニューキノロン耐性に関わる *gyrA* および *parC* 遺伝子の変異を検討した。*gyrA* 遺伝子変異を検出されなかったが、23S rRNA 遺伝子の変異と *parC* 遺伝子の変異が検出された。

Mutation in:		No.specimens (%) in:		
23S rRNA	<i>parC</i>	2013 n=18	2014 n=39	2015 n=36
-	-	8 (44)	16 (41)	18 (50)
+	-	2 (11)	2 (5)	7 (19)
-	+	5 (28)	9 (23)	4 (11)
+	+	3 (17)	11 (31)	7 (19)

表5 *M. genitalium* における 23S rRNA 遺伝子と *parC* 遺伝子の変異

2013 年と 2014 年には、*parC* 遺伝子変異がより高頻度に見られたが、2015 年には、23S rRNA 遺伝子の変異が高頻度であった(表5)。また、両者の遺伝子変異、すなわちマクロライド薬とニューキノロン薬の両者に耐性の *M. genitalium* が 20–30% の頻度で出現していることが示唆された。

(3) *Ureaplasma* spp. の薬剤耐性関連の遺伝子変異

*Ureaplasma* spp. に関して、*M. genitalium* と同様に 23S rRNA 遺伝子、*gyrA* および *parC* 遺伝子の変異の検出を行っている。

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 15 件)

Deguchi T, Yasuda M, Hatazaki K, Kameyama K, Horie K, Kato T, Mizutani K, Seike K, Tsuchiya T, Yokoi S, Nakano M, Yoh M. New Clinical Strain of *Neisseria gonorrhoeae* with Decreased Susceptibility to Ceftriaxone, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2016;22:142-4. doi: 10.3201/eid2201. 査読あり.

Deguchi T, Kikuchi M, Yasuda M, Ito S. Multidrug-Resistant *Mycoplasma genitalium* Is Increasing. *Clin Infect Dis.* 2016;62:405-6. doi: 10.1093/cid/civ898. 査読あり.

Deguchi T, Yasuda M, Horie K, Seike K, Kikuchi M, Mizutani K, Tsuchiya T, Yokoi S, Nakano M, Hoshina S. Drug resistance-associated mutations in *Mycoplasma genitalium* in female sex workers, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2015;21:1062-4. doi: 10.3201/eid2106.142013. 査読あり.

Kikuchi M, Ito S, Yasuda M, Tsuchiya T, Hatazaki K, Takanashi M, Ezaki T, Deguchi T. Remarkable increase in fluoroquinolone-resistant *Mycoplasma genitalium* in Japan. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:2376-82. doi: 10.1093/jac/dku164. 査読あり.

Kamiya Y, Shimada Y, Ito S, Kikuchi M, Yasuda M, Kawamura Y, Deguchi T. Analysis of the quinolone-resistance determining region of the *gyrA* gene and the analogous region of the *parC* gene

in *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* detected in first-void urine of men with non-gonococcal urethritis. J Antimicrob Chemother. 2013;68:480-2. doi: 10.1093/jac/dks417.

(3)連携研究者  
なし

〔学会発表〕(計6件)

安田 満 他 . 2013 年に男子淋菌性尿道炎患者より分離された淋菌の薬剤感受性報告 . 日本感染症学会第 27 回学術大会、2013 年 12 月 6 日、神戸ポートピアホテル (兵庫県、神戸市) .

〔図書〕(計0件)

〔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 (YSUDA Mitsuru)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 90311703