

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462456

研究課題名(和文) マイコプラズマ・ジェニタリウム尿道炎の抗菌薬治療に関する検討

研究課題名(英文) Study of antimicrobial therapy for Mycoplasma genitalium urethritis

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：M. genitalium(MG)は男性の非淋菌性尿道炎の原因微生物である。近年MGによる尿道炎の治療失敗例が増加しており、薬剤耐性と遺伝子変異との関連を検討した。しかし、MGの臨床検体からの分離培養は極めて困難であり、本研究ではマクロライド、キノロンに耐性を示す多剤耐性株を、我が国ではじめて分離した。現在、マクロライド耐性は約40%を超える。マクロライド耐性株にはmoxifloxacin(MFLX)と sitafloxacin(STFX)が有効であるが、parC遺伝子のpoint mutationによりMFLX耐性となり、加えてgyrAの変異によりSTFX耐性となる可能性を、本研究で示した。

研究成果の概要(英文)：M. genitalium (MG) is one of pathogen for male urethritis. Recently, treatment-failure cases of M. genitalium urethritis are increasing. We studied the relationship between antimicrobial resistance and genetic mutations of MG. However, the isolation and culturing of MG have still difficult and we isolated first MG strain with multi-drug resistance was isolated in Japan. Almost 40 % MG strains in Japan are macrolide-resistance. Against these macrolide-resistant strains, moxifloxacin(MFLX) or sitafloxacin(STFX) are effective. We indicated the possibility that the point mutation on parC gene in MG induces MFLX-resistance and additional mutation on gyrA gene induces STFX-resistance.

研究分野：性感染症

キーワード：Mycoplasma genitalium 尿道炎 sitafloxacin 耐性 moxifloxacin 耐性 マクロライド耐性 分離培養

## 1. 研究開始当初の背景

*M. genitalium*は性感染症としての男性非淋菌性尿道炎の原因菌の一つである。しかし、我が国では*M. genitalium*に対する検査は保険適用外であり、臨床研究が活発に行われているとは言いがたい。しかし、近年、男性尿道炎において抗菌薬による治療失敗例の報告が増えている。淋菌が分離されない非淋菌性尿道炎では、その約50%の症例から*C. trachomatis* (クラミジア)が分離される。このため、非淋菌性尿道炎の治療は、クラミジア性尿道炎の治療に準じて行われてきた。従って、クラミジアの有効なマクロライド、テトラサイクリン、ニューキノロンが使用され、このなかでも単回治療が可能であるazithromycin (AZM)が広く使用されてきた。もともと、テトラサイクリンは*M. genitalium*に対する抗菌活性は弱い。さらに、*M. genitalium*のマクロライドに対する耐性化が著明となっている。我々は、AZM治療失敗例の尿道スワブ検体より*M. genitalium*を分離培養し、マクロライド高度耐性株を分離した。これらの耐性株は、マクロライドの作用部位である23S rRNAにpoint mutationを起こし、耐性化していることを見出した(Jensen, J. Inf. Dis. 2008)。これらマクロライド耐性株に対しては、ニューキノロンの中でもmoxifloxacin (MFLX)やsitafloxacin (STFX)といった薬剤が臨床的にも、薬剤感受性でも有効である(Hamasuna, Antimicrob Agent Chemother, 2009, Takahashi, Infect J Chemother, 2013)。しかし、2013年にMFLX治療が失敗した症例がオーストラリアより報告された。我が国においてもSTFXによる治療が失敗した症例が報告され、性感染症を治療する医療者の間で大きな問題となっている。

*M. genitalium*のキノロン耐性の機序も、マクロライド同様遺伝子の変異が考えられている。しかし、最も大きな問題は*M. genitalium*の臨床検体からの分離および培養が、極めて困難であることである。1996年に、JS Jensen (本研究の海外共同研究者)が、Vero細胞に*M. genitalium*のPCR陽性検体を接種して新たな4株の分離を報告したが、現在において分離、培養が成功し、確立された*M. genitalium*株は世界で100株弱である。我が国の患者からは、研究代表者が分離した4株のみが、確立した株である。MFLX、STFXといったニューキノロン薬の耐性株は、数株が分離されているにすぎず、我が国ではいまだ分離されていない。多くの研究者が、検体中の*M. genitalium*遺伝子に遺伝子変異があることを報告しているが、単なる推測に過ぎない。つまり、*M. genitalium*では多くの細菌で行われている、薬剤感受性と抗菌薬の効

果との関係、また、耐性菌の耐性機序が明らかとなっていない。

*M. genitalium*の薬剤感受性は、研究代表者が開発したVero細胞上で発育する株を用い、抗菌薬を添付した培養液で*M. genitalium*の増殖をrealtime-PCR法を持ちてモニタリングすることにより、初代培養から早期に測定することができる(Hamasuna, Antimicrob Agent Chemother, 2006)。培養法も研究代表者が報告した尿沈渣を用いて培養する方法(Hamasuna, J Clin Microbiol, 2009)が使用できることより、抗菌薬による治療失敗例からの尿検体から、*M. genitalium*の分離、培養が可能である。

## 2. 研究の目的

研究代表者はデンマークのJS Jensen (本研究の海外共同研究者)のもとで培養技術を学び、臨床検体からの分離培養が可能である。さらに、抗菌薬による治療失敗症例の検体を、これまでの研究から保存しており、耐性株の分離培養が可能である。本研究は上記背景より、*M. genitalium*のニューキノロンの耐性機序を、*M. genitalium*株の培養を主体として検討すること、培養し確立した株の薬剤感受性と、解析を行うことである。さらに、耐性に関連した遺伝子の決定後、我が国における*M. genitalium*の耐性化の状況を検討することである。

## 3. 研究の方法

(1) 尿道炎患者からの*M. genitalium*の分離培養、分離株の薬剤感受性、およびその関連する遺伝子変異を解析

難治性尿道炎を含む男性尿道炎患者の尿検体より*M. genitalium*を分離培養した。検体は我々がこれまで行ってきた研究より採取、保存した尿道炎患者の尿検体、および、難治性尿道炎患者の尿検体である。*M. genitalium*の分離培養は、研究代表者が開発した方法により行った(Hamasuna, J Clin Microbiol, 2009)。Vero細胞に*M. genitalium*がPCR法で陽性の尿道炎患者の尿沈渣を加えて培養し、realtime-PCR法でモニタリングして、*M. genitalium*の発育を待った。薬剤感受性法は、研究代表者が開発した方法(Hamasuna, Antimicrob Agent Chemother, 2006)に準じた。つまり、Vero細胞上で発育した*M. genitalium*を、段階希釈した抗菌薬を含む培養液で培養させ、その増殖をrealtime PCR法にて測定し、99%増殖を抑制した抗菌薬濃度を最低阻止濃度(minimum inhibitory concentration; MIC)とした。*M. genitalium*の遺伝子変異は、23S rRNAのdomain V、*gyrA*および*parC*遺伝子のキノロン耐性決定領域(quinolone-resistance determining region: QRDR)をdirect sequence法にてシークエンスし、標準株(G37

株)の遺伝子と比較して変異を決定した。さらに、研究代表者が保有する *M. genitalium* 株の薬剤感受性と遺伝子変異も解析して、耐性株と比較した。

(2) 我が国における *M. genitalium* の薬剤耐性率の検討

我々がこれまで行ってきた研究より分離、保存した *M. genitalium* 遺伝子、および新たに検討した尿検体から分離した *M. genitalium* 遺伝子を用いた。上記検討により、薬剤耐性と関連する遺伝子を決定し、これら *M. genitalium* 遺伝子における耐性遺伝子の保有率を、年代別に解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 本検討にて、新たに3株 (IMC-1, OSSP35-P2, JMPP4) が分離、培養が成功し、そのうち2株 (IMC-1, OSSP35-P2) はマクロライドおよびキノロン耐性株と考えられた。今回検討した *M. genitalium* 株は合計株であり、標準株の G37 および標準株と同じ時期に分離された M30、デンマーク由来4株、フランス由来3株、スウェーデン由来7株、日本由来7株 (新たに分離した3株を含む) の合計23株である。このうち4株 (M6257, M6489, IMC-1, OSSP35-P2) はマクロライド耐性株であった。これらの4株に対する AZM および clarithromycin (CAM) の MIC は、いずれも 16mg/L 以上であり、高度耐性株であった。さらに 23S rRNA の遺伝子変異がこれらの4株では見られ、A5058G および A5059G であった。

ニューキノロン薬に対しては、ciprofloxacin (CPFX) および levofloxacin (LVFX) の MIC が 1 mg/L 以上の株は、それぞれ 19 株 (82.6%)、18 株 (78.3%) であった。標準株 G37 に対する CPFX, LVFX の MIC はそれぞれ 8、2mg/L であり、*M. genitalium* は基本的には CPFX および LVFX には耐性であることが分かった。これに対し、MFLX または STFX の MIC が 1 mg/L 以上の株は 3 株 (13.0%) のみであり、スウェーデン由来の M6489 と我が国で新たに分離された IMC-1 と OSSP35-P2 であった。この3株はいずれもマクロライド耐性であり、多剤耐性株であった。M6489 はスウェーデンで分離された株であり、約2年簡マクロライド、キノロン、テトラサイクリンなど多くの抗菌薬を使用するも無効であった尿道炎から分離され、MFLX と STFX の MIC は 16、1mg/L であった。IMC-1 は日本人から分離された株で、テトラサイクリン、AZM、STFX、MFLX を使用するも無効であった症例で、MFLX と STFX の MIC は 4、1mg/L であった。OSSP35-P2 も日本人から分離された株で、AZM 無効で、その後 STFX により治療した症例であり、MFLX と STFX の MIC は 2、0.25mg/L であり、本症例は MFLX 耐性、STFX 感受性と考えられた。これらの詳細を表1, 2 に示す。これら3株はすべて *parC* の QRDR に変異を持ち (G248T)、80 番の Serine が

Isoleucin となるアミノ酸変異を伴っていた。この変異はほかの株には見られず、MFLX に関連する変異と考えられた。さらにこれら3株は *gyrA* の QRDR にもアミノ酸変異を伴う変異を保有していたが、それぞれ異なる変異であり、3株以外に *parC* と *gyrA* にアミノ酸変異を伴う変異をもつものはなかった。これらの観察から、おそらく *parC* の ser80 Ile のアミノ酸変異が MFLX の変異と関連しており、その耐性の程度は *gyrA* の変異の部位に関連があること、STFX は MFLX より *M. genitalium* に対して抗菌活性が高く、MFLX 耐性に加えて *gyrA* の変異が加わり耐性となることが想定できた。

表1

株名	遺伝子変異		
	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	23S rRNA
G37 <sup>T</sup>	-	-	-
M6489	ASP80 Asn	Ser83 Ile	A2058G
IMC-1	Gly83 Cys	Ser83 Ile	A2059G
OSSP35-P2	Met83 Ile	Ser83 Ile	A2058G

表2

株名	MIC (mg/L)					
	CPFX	LVFX	MFLX	STFX	AZM	CAM
G37 <sup>T</sup>	8	2	0.06	0.125	0.002	0.004
M6489	>16	>16	16	1	>16	>16
IMC-1	>16	>16	4	1	>16	>16
OSSP35-P2	16	8	2	0.25	>16	>16

(2) マクロライド耐性を 23S rRNA における A5058G および A5059G の変異とし、キノロン耐性、特に MFLX 耐性を *parC* 遺伝子の QRDR における G248T (アミノ酸変異で Ser80 Ile) として、我々が非有する *M. genitalium* 遺伝子における耐性率を計算した。2005-2008年に採取した87の *M. genitalium* 遺伝子のうち、マクロライド耐性は 4.8% (4/87)、キノロン耐性は 3.6% (3/87) であったが、2010-2017年に採取した64遺伝子では、マクロライド耐性は 42.2% (27/64)、キノロン耐性は 15.6% (10/64) と明らかに耐性率に増加がみられた。さらにマクロライドおよびキノロンともに耐性である多剤耐性の割合は、2005-2008年では認められなかったが、2010-2017年には 12.5% (8/64) と増加していた。

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 10 件)

R. Hamasuna, M. Ohnishi, M. Matsumoto, R. Okumura, M. Unemo, T. Matsumoto. *In vitro* activity of sitafloxacin and additional newer-generation fluoroquinolones against ciprofloxacin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates. Microbial Drug Resistance. 査読あり 24:2018. 30-4.

DOI: 10.1089/mdr.2017.0054.

A. Jönsson, S. Foerster, D. Golparian, R. Hamasuna, S. Jacobsson, M. Lindberg, JS. Jensen, 他(8名中4番目). *In vitro* activity and time-kill curve analysis of sitafloxacin against a global panel of antimicrobial-resistant and multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates. 査読あり APMIS. 26: 2018. 29-37.

DOI: 10.1111/apm.12777.

瀧砂良一. 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. 日本医師会雑誌 査読なし 146: 2018. 2489 - 92.

瀧砂良一. 非淋菌性尿道炎の第一選択に何を選択すべきか. 日本化学療法学会雑誌. 査読あり 66: 2018. 173-84.

瀧砂良一, 松本正広, レティ ファン, 藤本直浩, 松本哲朗. 男子尿道炎からの *Mycoplasma genitalium* 検出のためのキットの検討. Journal of UOEH. 査読あり 40:2018. 45-52.

瀧砂良一. 産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. 臨床婦人科産科 査読なし 72: 2018. 25 - 34.

瀧砂良一, 安田満, 山本新吾, 伊東健治, 川原和也, 川原元司. 松本哲朗 他(11名中1番

目、11番目)急性細菌性前立腺炎および急性精巣上体炎を対象とした levofloxacin 注射薬の第 III 相臨床試験 注射薬から経口薬への切り替え療法による検討. 日本化学療法学会雑誌. 査読あり 65: 2017. 484-90.

瀧砂良一. 性器クラミジア感染症・非クラミジア性非淋菌性尿道炎. 泌尿器 Care & Cure URO-Lo 査読なし 22:2017. 79-84.

安田満, 瀧砂良一, 山本新吾, 南谷新一、奥田恭行, 松本哲朗. 尿路感染症における pazufloxacin を対照薬とした levofloxacin 注射薬の第 III 相比較試験 注射薬から経口薬への切り替え療法による検討. 日本化学療法学会雑誌. 査読あり 64: 2016. 796-812.

瀧砂良一. 性感染症. 腎と透析 査読なし 81:2016. 585-90.

[学会発表](計 11 件)

R. Hamasuna, M. Matsumoto, PT Le, N. Fujimoto, T. Matsumoto. The mutations on genes related to macrolide or fluoroquinolone resistance on *M. genitalium* in Japan. STI & HIV World Congress 2017, Rio de Janeiro, Brazil, 2017/7/9-12

R. Hamasuna, STI, AAUS symposium in UAA 2017, 15<sup>th</sup> Asian Congress of Urology, Hong Kong, 2017/8/4-6

瀧砂良一, シンポジウム 12 「性感染症の治療における 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. 第 65 回日本化学療法学会, 東京, 2017//6-8

瀧砂良一, 忽那賢志, 松本正広, 藤本直浩, 松本哲朗, 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. 日本性感染症学会 第 30 回学術大会. 札幌, 2017/12/2-3

R. Hamasuna, PY Le, M. Matsumoto, N.

Fujimoto, T. Matsumoto. The detection of pathogens for non-gonococcal urethritis from the oral cavity of patients with male urethritis. 17<sup>th</sup> IUSTI World Congress. Marrakesh, Morocco, 2016/5/8-12

R. Hamasuna, Symposium; Digest of UAA/AAUS Guidelines for Genitourinary Tract Infection (UTI/GTI/STI) Sexually transmitted infections, 14<sup>th</sup> Urological Association of Asian Conference 2016, Singapore, 2016/7/20-24

R. Hamasuna, Symposium10 Treatment strategies for M. genitalium infection-resistant status and new treatment. Multidrug-resistant M. genitalium strains, 19<sup>th</sup> Asian-Pacific IUSTI conference, Okayama, Japan 2016/12/1-3

濱砂良一, シンポジウム 2. ヒトの臨床におけるマイコプラズマ感染症の多様性と課題. 泌尿器科の立場から—M. genitalium の薬剤感受性と耐性化. 日本マイコプラズマ学会 第 43 回各術集会, 長崎, 2016/6/24-25

濱砂良一, シンポジウム 5. 「尿路性器感染症に関する臨床試験実施のためのガイドライン～第 1 版の問題点と改訂について～」第 2 版 性器感染症. 第 64 回日本化学療法学会, 神戸, 2016/6/9-11

濱砂良一, シンポジウム 2 尿道炎原因菌に対する抗菌活性 Mycoplasma genitalium の薬剤感受性と治療. 日本性感染症学会 第 29 回学術大会. 岡山, 2016/12/3-4

R. Hamasuna, M. Yasuda, S. Takahashi, G. Lee, S. Gupta. Syosium. Drafting the UAA/AAUS guideline for UYI/STI. UAA/AAUS guideline-preliminary recommendation for treatment of

urethritis. 12<sup>th</sup> Asian Congress of Urology, Kish Island, Iran, 2014/12/5-8

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

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

### (3) 研究協力者

Jensen Jorge Skov (JENSEN, Jorgen, Skov)