



# 岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

## 淋菌臨床分離株の抗菌剤感受性の年次変化と経口セファロスポリン剤耐性機序の解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-07-16 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 伊藤, 雅康 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/12583">http://hdl.handle.net/20.500.12099/12583</a>

# 淋菌臨床分離株の抗菌剤感受性の年次変化と 経口セファロスポリン剤耐性機序の解析

伊藤 雅康

岐阜大学医学部臓器病態学講座泌尿器病態学分野 (主任 出口 隆教授)

## Chronological Changes in Susceptibilities to Antimicrobial Agents and Mechanisms of Oral Cephalosporin Resistance in Clinical Isolates of *Neisseria gonorrhoeae*

Masayasu ITO

*Department of Urology, Division of Pathobiology, Gifu University School of Medicine*

(Director: Prof. T. DEGUCHI)

Clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* recovered from 462 men with gonorrhea from 1999 through 2002 were examined for minimum inhibitory concentrations (MICs) of antimicrobial agents. Ninety-one, 150, and 221 isolates were collected in 1999–2000, 2001 and 2002, respectively. The prevalence of penicillinase-producing *N. gonorrhoeae* was very low over 4 years, but that of chromosomally mediated resistance to penicillin G increased to 73.3% in 2002. The prevalence of levofloxacin resistance also increased to 78.3% in 2002. No strain with a cefixime MIC  $\geq 0.5 \mu\text{g}/\text{m}\ell$  was isolated in 1999–2000, but 26.0% and 30.3% of the isolates had cefixime MICs  $\geq 0.5 \mu\text{g}/\text{m}\ell$  in 2001 and 2002, respectively. Ceftriaxone was still active against clinical isolates over 4 years, but two isolates with a ceftriaxone MIC of  $0.5 \mu\text{g}/\text{m}\ell$  were found in 2002. Only one spectinomycin-resistant strain was isolated in 2001. A remarkable increase of *N. gonorrhoeae* with decreased susceptibility to antimicrobial agents, especially fluoroquinolones and cephalosporins, was observed in 2000–2001. Among the clinical isolates recovered in 2001, 55 isolates with cefixime MICs  $\geq 0.125 \mu\text{g}/\text{m}\ell$  and 15 isolates with cefixime MICs  $\geq 0.06 \mu\text{g}/\text{m}\ell$  were examined for alterations in the penicillin-binding protein 2 (PBP 2) gene. A mosaic PBP 2 composed of fragments from PBP 2 of *Neisseria cinerea* and *Neisseria perflava* was found in 47 isolates. This mosaic PBP 2 was significantly associated with decreased susceptibilities to penicillin and cephalosporins, especially oral cephalosporins. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of chromosomal DNA restriction patterns revealed that most isolates with the mosaic PBP 2 were genetically similar. The emergence and increase of such strains could arise from the spread of a limited number of clones.

Acta Sch Med Univ Gifu 52 : 6–13 (2004)

Key words : *Neisseria gonorrhoeae*, drug susceptibility

### 緒 言

Penicillin 耐性や tetracycline 耐性淋菌の出現以来、ニューキノロン剤やセファロスポリン剤が淋菌感染症の治療薬として推奨されてきた<sup>1,2)</sup>。ニューキノロン剤は、淋菌感染症に対して優れた有効性を発揮してきた

が、1990年代半ばよりニューキノロン剤耐性菌の出現が報告され、以後、耐性菌の著明な増加が認められている<sup>3)</sup>。現在では、ニューキノロン剤の淋菌感染症の治療薬としての臨床的有用性は低下し、その使用は推奨されていない<sup>4)</sup>。淋菌のニューキノロン剤耐性化後は、セファロスポリン剤が淋菌感染症の重要な治療薬として繁用さ

れてきたが、経口セファロスポリン剤に対する感受性の低下した淋菌臨床分離株が出現し始め、臨床上問題となってきた<sup>5)6)</sup>。

淋菌の抗菌剤に対する耐性化機序については、多くの報告がなされてきた。ペニシリン耐性には、プラスミッド上の TEM-1  $\beta$ -lactamase 遺伝子による penicillinase 産生によるもの<sup>7)</sup>と penicillin-binding protein 2 (PBP 2) をコードする *penA* 遺伝子の変異<sup>8)</sup>, porin と関連する *penB* 遺伝子座<sup>9)</sup>, 疎水性物質の排泄に関わる MtrCDE efflux pump の発現に参与する *mtr* 遺伝子座の変異<sup>10)</sup>による染色体性のものとが報告されている。テトラサイクリン耐性についてもプラスミッド上の *tetM* 遺伝子による高度の耐性化<sup>11)</sup>と染色体上の遺伝子変異による耐性化とが報告されている<sup>8)~10)</sup>。ニューキノロン耐性には、薬剤の標的酵素である DNA gyrase および DNA topoisomerase の変化が他の細菌と同様に淋菌においても重要な役割を果たしている<sup>12)13)</sup>。しかしながら、これらの報告されてきた耐性機序は、臨床上問題となるほどの経口セファロスポリン剤の感受性の低下には関与していない。最近、経口セファロスポリン剤低下感受性淋菌において従来の報告とは著しく異なる *penA* 遺伝子のモザイク様構造が報告され、経口セファロスポリン剤耐性化との関連が示唆されている<sup>14)</sup>。

今回、岐阜大学およびその関連施設を受診した男子淋菌性尿道炎患者より分離された淋菌臨床分離株の1999年から2002年にかけての各種薬剤感受性の年次変化を検討し、2001年に分離された経口セファロスポリン剤低感受性菌株について *penA* 遺伝子の解析と経口セファロスポリン耐性化との関連を検討した。また、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) によりモザイク様構造の PBP 2 を持つ菌株について遺伝子的類似性を検討した。

## 材料と方法

### 1. 淋菌臨床分離株

1999年4月から2002年12月に岐阜大学病院および関連病院の泌尿器科を訪れた男子淋菌性患者から分離された462株を対象とし、各種抗菌剤の minimum inhibitory concentration (MIC) を測定した。91株, 150株および221株が、それぞれ1999年4月から2000年12月, 2001年1月から12月および2002年1月から12月に分離された。

2001年に分離された菌株のうち、cefixime の MIC が  $0.004\mu\text{g/ml}$ ,  $0.015\mu\text{g/ml}$  および  $0.06\mu\text{g/ml}$  であるそれぞれ5株, 計15株と  $0.125\mu\text{g/ml}$  以上の55株について protein-binding protein 2 (PBP 2) をコードする *penA* 遺伝子の解析を行った。さらに、これら菌株のうちモザイク様構造 PBP 2 を有する臨床分離株47株についてその遺伝子的類似性を PFGE にて検討した。

### 2. MIC の測定

淋菌臨床分離株462株に対する penicillin G, tetracycline, cefixime, cefdinir, cefcapene pivoxil, cefodizime, ceftriaxone, levofloxacin およびの spectinomycin の MIC を National

Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 法<sup>15)</sup> に準じて測定した。さらに、nitrocefin ディスクにより  $\beta$ -lactamase の産生の有無を検討した。

### 3. *penA* 遺伝子の解析

既に報告された *penA* 遺伝子の遺伝子配列 (GenBank accession no. M32091)<sup>16)</sup>にしたがって、7種類の oligonucleotide を合成した (Table 1)。PenA-A1 と PenA-B1,

Table 1 Primers for PCR amplification and sequencing of the *penA* gene of *N. gonorrhoeae*

Primer	Nucleotide sequence, 5' to 3'	Nucleotide Positions <sup>a</sup>
PenA-A 1	CGGGCAATACCTTTATGGTGGAAAC	8-31
PenA-B 1	AACCTTCCTGACCTTTGCCGTC	655-676
PenA-A 2	AAAACGCCATTACCCGATGGG	597-617
PenA-B 2	TAATGCCCGCACATCCAAAG	1157-1177
PenA-A 3	GCCGTAACCGATATGATCGA	1003-1022
PenA-B 3	CGTTGATACTCGGATTAAGACG	1844-1865
PenA-A 4	AATTGAGCCTGCTGCAATTGGC	1376-1397

<sup>a</sup>Nucleotide numbering is derived from the *penA* gene of a penicillin-susceptible strain of *N. gonorrhoeae* (GenBank accession no. M32091).

PenA-A 2 と PenA-B 2 および PenA-A 3 と PenA-B 3 の primer の組み合わせによる PCR 法により、3つの遺伝子断片に分け *penA* 遺伝子の全長を増幅した。PCR 産物は、オートシーケンサー (model3100; Applied Biosystems, Inc., Foster City, Calif., U.S.A.) を用いて dye terminator 法により塩基配列を決定した。塩基配列には、PenA-A1, PenA-A2, PenA-A3, PenA-A 4 PenA-B1, PenA-B2, および PenA-B 3 を塩基配列用 primer として用いた。

### 4. PFGE によるゲノム DNA の解析

淋菌臨床分離株のゲノム DNA を制限酵素 *SpeI* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) で処理し、切断された DNA 断片を PFGE にて分離した<sup>17)</sup>。電気泳動は CHEF DR III system (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif. U.S.A.) を用いて1.0%アガロースゲル内で6 V/cm, パルス時間5秒から35秒および14°Cの条件で19.5時間行った。PFGEにより分離されたDNA断片プロフィールは、BioNumeric 解析ソフト (Applied Maths, Sint-Martenes-Latem, Belgium) を用いて解析を行った。

### 5. 統計学的検討

抗菌剤の MIC 分布の比較には、Mann-Whitney U test を用いた。有意水準5%未満を有意差とした。

## 結 果

### 1. 淋菌臨床分離株の各種抗菌剤に対する感受性の年次変化

1999年と2000年の91株, 2001年の150株および2002年の

Table 2 MICs of antimicrobial agents for clinical strains of *N. gonorrhoeae* recovered from 1999 to 2002

Antimicrobial agent	MIC <sup>a</sup> ( $\mu\text{g}/\text{m l}$ )								
	1999–2000 (n=91)			2001 (n=150)			2002 (N=221)		
	Range	50%	90%	Range	50%	90%	Range	50%	90%
Penicillin G	0.008->32	0.25	1	0.06->32	2	4	0.06->32	2	8
Tetracycline	0.008->32	0.5	2	0.125->32	2	4	0.125->32	2	4
Levofloxacin	$\leq 0.004$ -8	0.125	4	$\leq 0.004$ -32	1	8	0.008-64	8	16
Cefixime	$\leq 0.004$ -0.125	0.008	0.06	$\leq 0.004$ -1	0.06	0.5	$\leq 0.004$ -2	0.06	0.5
Cefdinir	$\leq 0.004$ -1	0.015	0.5	0.015-2	0.06	1	$\leq 0.004$ -0.125	0.06	1
Cefcapene pivoxil	$\leq 0.004$ -2	0.03	0.5	$\leq 0.004$ -8	0.25	4	$\leq 0.004$ -16	0.5	4
Ceftriaxone	$\leq 0.004$ -0.06	0.008	0.03	$\leq 0.004$ -0.25	0.03	0.125	$\leq 0.004$ -0.5	0.06	0.125
Cefodizime	$\leq 0.004$ -0.5	0.015	0.06	$\leq 0.004$ -0.5	0.06	0.25	$\leq 0.004$ -4	0.125	0.25
Spectinomycin	1-32	16	32	4-256	16	32	4-64	16	32

<sup>a</sup>50%, MIC at which 50% of the isolates is inhibited ; 90%, MIC at which 90% of the isolates is inhibited.

Table 3 Prevalence of resistance to antimicrobial agents in clinical strains of *N. gonorrhoeae* recovered from 1999 to 2002

Strains	Prevalence (%)		
	1999-2000	2001	2002
	(n=91)	(n=150)	(n=221)
Penicillinase-producing	1.1	0.7	0.5
High-level tetracycline resistance (MIC $\geq 16\mu\text{g}/\text{m l}$ )	2.2	0.7	0.5
Chromosomally mediated resistance to penicillin (MIC $\geq 2\mu\text{g}/\text{m l}$ )	2.2	59.3	73.3
Chromosomally mediated resistance to tetracycline (MIC $\geq 2\mu\text{g}/\text{m l}$ )	11.0	53.7	68.8
Levofloxacin resistance (MIC $\geq 1\mu\text{g}/\text{m l}$ equivalent to ofloxacin MIC $\geq 2\mu\text{g}/\text{m l}$ )	27.5	53.3	78.3
Decreased susceptibility to cefixime (MIC $\geq 0.5\mu\text{g}/\text{m l}$ )	0	26.0	30.3
Decreased susceptibility to ceftriaxone (MIC $\geq 0.5\mu\text{g}/\text{m l}$ )	0	0	0.9
Spectinomycin resistance (MIC $\geq 128\mu\text{g}/\text{m l}$ )	0	0.7	0

221株の抗菌剤感受性を (Table 2) に示す。Penicillin G の MIC (Table 2) は、年次的に有意に上昇したが、penicillinase 産生淋菌は、各時期とも 1 株のみの分離であり低率であった (Table 3)。染色体性ペニシリン耐性 (MIC $\geq 2\mu\text{g}/\text{m l}$ )<sup>18)</sup> 淋菌の割合については、1999年から2000年の株では2.2%であったのが、2001年の株では59.3%となりさらに2002年の株では73.3%と急速に上昇した。

Tetracycline の MIC 分布についても、1999年から2002年にかけて分離された菌株において年次的な有意の上昇が認められた (Table 2)。*tetM* 遺伝子が関与するとされるテトラサイクリン高度耐性 (MIC $\geq 16\mu\text{g}/\text{m l}$ )<sup>18)</sup> 淋菌は、1999年から2000年で2株、2001年に1株および2002年に1株に認められた。染色体性テトラサイクリン耐性 (MIC $\geq 2\mu\text{g}/\text{m l}$ )<sup>18)</sup> 淋菌の割合については、1999年から2000年の株では11.0%であったのが、2001年の株では53.7%となりさらに2002年の株では68.8%と上昇した (Table 3)。

Levofloxacin の MIC 分布についても、1999年から2002年にかけて分離された菌株において年次的な有意の上昇が認められた (Table 2)。臨床分離株の90%を阻止する MIC

(MIC90) は1999年から2000年では  $4\mu\text{g}/\text{m l}$  であったが、2001年の株では  $8\mu\text{g}/\text{m l}$  となりさらに2002年の株では  $16\mu\text{g}/\text{m l}$  と上昇した。ニューキノロン耐性 (levofloxacin MIC $\geq 1\mu\text{g}/\text{m l}$ )<sup>18)</sup> 淋菌の割合は、1999年から2000年の株の27.5%から2001年の株の53.3%、さらに2002年の株の78.3%と急速に上昇した (Table 3)。

Cefixime, cefdinir および cefcapene pivoxil の MIC は、1999年から2000年の株に比較して2001年の株で有意に上昇した (Table 2)。Cefdinir および cefcapene pivoxil の MIC については、2001年の株に比較して2002年の株で有意に上昇した。1999年から2000年の株では、cefixime の MIC が  $0.5\mu\text{g}/\text{m l}$  以上の株は分離されなかったが、2001年には26.0%、2002年には30.3%に分離され、2001年および2002年の菌株に対する MIC90は、ともに  $0.5\mu\text{g}/\text{m l}$  であった。2001年の菌株に対する ceftriaxone および cefodizime の MIC は、1999年から2000年の株に比較して有意に上昇していたが、2002年の株に対しては有意の差を認めなかった (ceftriaxone については  $p=0.261$ , cefodizime については  $p=0.901$ )。1999年から2000年の株と2001年の株では、ceftriaxone の MIC が  $0.5\mu\text{g}/\text{m l}$  以上の

株は分離されなかったが、2002年の株では2株(0.9%)が $0.5\mu\text{g}/\text{m}\ell$ であった(Table 3)。

SpectinomycinのMIC分布については、1999年から2002年にかけて有意の変化は認められなかった(Table 2)。しかしながら、2001年にスペクチノマイシン耐性菌(MIC $\geq 128\mu\text{g}/\text{m}\ell$ )<sup>18)</sup>が1株分離された(Table 3)。

## 2. PBP 2 の変化

2001年に分離された菌株のうち、cefiximeのMICが $0.004\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 、 $0.015\mu\text{g}/\text{m}\ell$ および $0.06\mu\text{g}/\text{m}\ell$ であるそれぞれ5株および $0.125\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 以上の55株の合計70株についてPBP 2をコードするpenA遺伝子の解析を行った。これら70株のPBP 2に10パターンのアミノ酸配列を認めた。それらをペニシリン感受性淋菌LM306のpenA遺伝子(GenBank accession no. M32091)より翻訳したPBP 2のアミノ酸配列と比較した(Fig. 1)。パターンIからIXでは、明らかにパターンXと異なっていた。パターンIでは、アスパラギン酸(Asp-345a)が挿入されていたが、他のアミノ酸配列はペニシリン感受性淋菌

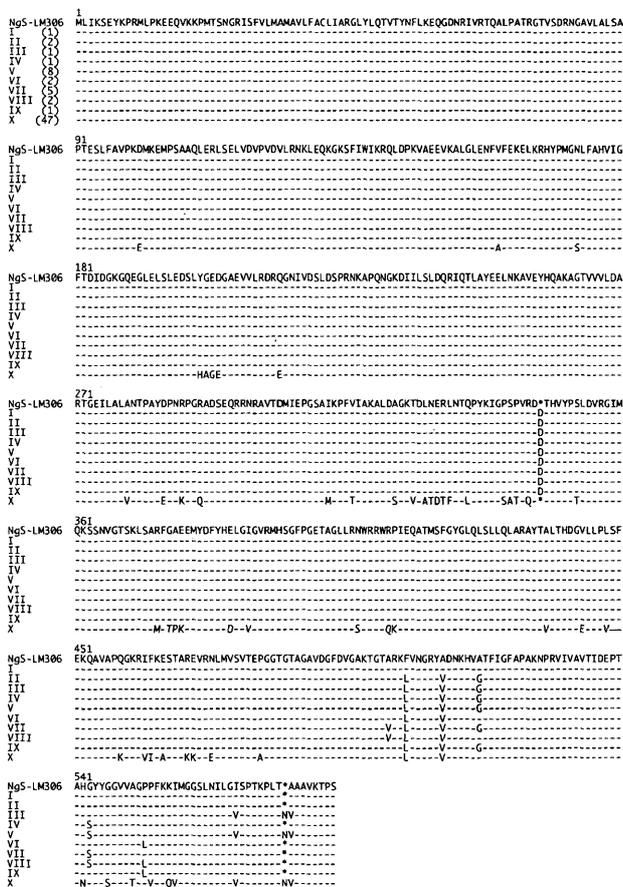


Fig. 1 Amino acid sequences of penicillin-binding protein (PBP) 2 from *N. gonorrhoeae* clinical isolates. The PBP 2 of penicillin-susceptible *N. gonorrhoeae* (NgS-LM306) is derived from the penA gene of penicillin-susceptible strain LM 306 (GenBank accession no. M32091). The amino acid sequences of PBP 2 of clinical isolates are classified into ten patterns (I - X) and aligned with that of penicillin-susceptible *N. gonorrhoeae* (NgS-LM306). The numbers of isolates with each pattern are indicated in parentheses. Dashes indicate amino acid residues identical to those of penicillin-susceptible *N. gonorrhoeae* (NgS-LM306).

LM306と同一であった。パターンIIからIXでは、アスパラギン酸(Asp-345a)が挿入され、パターンIIIとVでは他のアミノ酸(Asn-573a)の挿入がみられた。さらに、パターンIIからIXでは、Ala-501→Val, Phe-504→Leu, Ala-510→Val, Ala-516→Gly, Gly-542→Ser, Pro-551→Leu, Ile-566→ValおよびAla-574→Valの8種類のアミノ酸の変化が観察され、そのうちの3から6つのアミノ酸の変化が同時に認められた。PBP 2のtranspeptidase domain内のアスパラギン酸(Asp-345a)の挿入は、今回検討した70株中23株に認められた。

パターンXのPBP 2のアミノ酸配列は、ペニシリン感受性淋菌LM306と比較して90%の類似性を示したにすぎず、*Neisseria cinerea*と*Neisseria perflava*のPBP 2の一部から構成されるモザイク状の構造を示した(Fig. 2)。特に、パターンXのPBP 2のtranspeptidase domainは、*N. cinerea*と*N. perflava*のPBP 2から再構成したモザイク構造との間に99.3%の類似性を示した。このパターンのPBP 2は、70株中47株に認められた。

## 3. PBP 2 の変化と抗菌剤感受性

PBP 2のアミノ酸配列の変化のパターンとpenicillin Gおよびcefixime, cefdinirおよびceftriaxoneのMICとの関連を(Fig. 3)に示した。アスパラギン酸(Asp-345a)が挿入されたパターンIからIXの菌株に対するpenicillin GのMICは、 $0.125\mu\text{g}/\text{m}\ell$ から $4\mu\text{g}/\text{m}\ell$ であり、一方、モザイク状の構造を持つパターンXの菌株に対するMICは、 $0.5\mu\text{g}/\text{m}\ell$ から $8\mu\text{g}/\text{m}\ell$ であった。パターンIからIXの菌株に対するpenicillin GのMICの分布は、モザイク状の構造を持つパターンXの菌株に対する分布と重なるものの、後者のMICが前者のMICに比べ有意

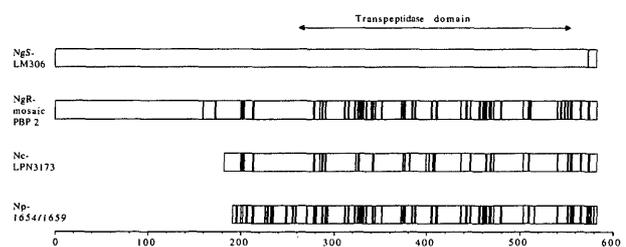


Fig. 2 Mosaic-like structure of PBP 2 in *N. gonorrhoeae* clinical isolates (NgR-mosaic PBP 2). This mosaic structure is composed of fragments that present in PBP 2 of *N. cinerea* strain LPN3173 (Nc-LPN3173) and *N. perflava* strain 1654 / 1659 (Np-1654 / 1659). Solid boxes in PBP 2 of *N. gonorrhoeae* clinical isolates (NgR-mosaic PBP 2) indicate amino acids that differ from corresponding amino acids of PBP 2 of penicillin-susceptible *N. gonorrhoeae* strain LM 306 (NgS-LM306) but are identical to those of PBP 2 of *N. gonorrhoeae* clinical isolates (NgR-mosaic PBP 2). Shaded boxes in PBP 2 of *N. cinerea* (Nc-LPN3173) and *N. perflava* (Np-1654 / 1659) indicate amino acids that differ from the corresponding amino acids of PBP 2 of *N. gonorrhoeae* strain LM 306 (NgS-LM306) and those of PBP 2 of *N. gonorrhoeae* clinical isolates.

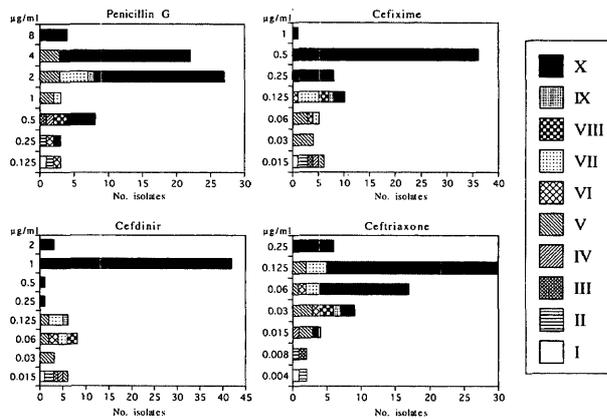


Fig. 3 Distributions of MICs of penicillin G, cefixime, cefdinir, and ceftriaxone for the clinical isolates of *N. gonorrhoeae* with various patterns of alterations in PBP 2. The patterns of alterations showed in Fig. 1 are indicated in the box.

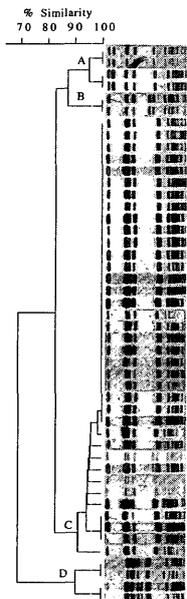


Fig. 4 PFGE profiles of *SpeI*-digested chromosomal DNAs from 47 clinical isolates of *N. gonorrhoeae* with the mosaic-like structure of PBP 2. The dendrogram was created by the computer-assisted analysis of the PFGE profiles. The profiles are classified into a major cluster (C) and three minor clusters (A, B, and D).

に高かった。モザイク状の構造を持つパターンXの菌株に対する cefixime および cefdinir の MIC は、パターンIからIXの菌株に対する MIC に比較して有意に高く、前者の菌株のほとんどあるいはすべては MIC が  $0.25 \mu\text{g/ml}$  以上の群に、後者の菌株は MIC が  $0.125 \mu\text{g/ml}$  以下の群に含まれた。さらに、モザイク状の構造を持つパターンXの菌株の多数が、cefixime の MIC  $0.5 \mu\text{g/ml}$  以上および cefdinir の MIC  $1 \mu\text{g/ml}$  以上を示した。Ceftriaxone についても同様にモザイク状の構造を持つパターンXの菌株に対する MIC は、パターンIからIXの菌株に対する MIC に比較して有意に高かったが、すべての菌株に対する MIC は  $0.25 \mu\text{g/ml}$  以下であり、セフトリアキソン感受性群<sup>18)</sup>に含まれた。

#### 4. モザイク状構造の PBP 2 を持つ菌株の遺伝子学的類似性

モザイク状構造の PBP 2 を持つ47株について、制限酵素 *SpeI* にて切断されたゲノム DNA 断片の PFGE プロフィールとその類似性を (Fig. 4) に示した。これら

47株は1つの大きなクラスター (C) と3つの小さなクラスター (A, B と D) とに分けられた。クラスターCの37株中26株が同一の PFGE プロフィールを示し、これらを含め37株が90%以上の類似性を示した。同一の PFGE プロフィールを示した26株は、5つの病院を受診した淋菌性尿道炎患者から分離されていた。クラスターAの4株は、90%以上の類似性を示し、さらに、それぞれ2株ずつは同一の PFGE プロフィールを示したが、クラスターCとの類似性は82%であった。クラスターBの2株は同一の PFGE プロフィールを示したが、クラスターCとは82%類似性であった。クラスターDの4株は、90%以上の類似性を示し、さらに、それぞれ2株ずつは同一の PFGE プロフィールを示したが、クラスターCとは67%の類似性を示すにすぎなかった。

## 考 察

1999年から2002年までの4年間の短期間の検討にも関わらず、淋菌臨床分離株の各種薬剤感受性は著しい変化を示した。日本では淋菌感染症の治療のためにペニシリンおよびテトラサイクリンはほとんど使用されていないにも関わらず、染色体性ペニシリン耐性および染色体性テトラサイクリン耐性淋菌は著しく増加していた。

ニューキノロン剤は、日本において1980年代半ばより淋菌性あるいは非淋菌性を問わず尿道炎治療に繁用されてきた。淋菌性尿道炎では、*Chlamydia trachomatis* と淋菌との混合感染が約20%から30%に認められる。淋菌性尿道炎の症例では、淋菌に対する治療により症状が改善すると、治療後に再診しない例も少なくなく、そのために *C. trachomatis* 感染症が潜在化し、sexually transmitted diseases (STD) の感染源となる可能性がある。STD の流行の防止の面から淋菌性尿道炎においては、*C. trachomatis* の混合感染が必ずあるものとして両者に有効な薬剤を投与することが推奨されてきた。特に日本で開発されたニューキノロン剤は、淋菌および *C. trachomatis* に対して有効な薬剤であり、1剤にて両者に対する治療が可能であることより、淋菌性および非淋菌性を含め男子尿道炎の治療薬として意義ある抗菌剤とされ繁用されてきた<sup>19)</sup>。しかも、*C. trachomatis* の治療をも目的とするために1日投与量の分割と1週間以上の長期投与が行われてきた。このような背景の下に、ニューキノロン剤耐性淋菌の出現と流行を生み出した<sup>3)</sup>。日本におけるニューキノロン剤による淋菌感染症治療失敗の最初の報告は、1993年に行われており<sup>20)</sup>、その後、1990年代後半には耐性淋菌の急速な増加が日本各地から報告された<sup>3)</sup>。1999年の日本性感染症学会からの治療ガイドラインからはニューキノロン剤は除外された<sup>4)</sup>。しかしながら、それにも関わらず今回の検討では、ニューキノロン剤耐性菌の割合の増加とさらにより高度の耐性化が観察された。

1990年代後半より淋菌のニューキノロン剤耐性化により経口セファロsporin剤が繁用されてきた。今回の検討で1999年から2000年の菌株に対する代表的な経口セファ

ロスポリン治療薬である cefixime の MIC は、 $0.125\mu\text{g}/\text{m}\ell$  以下であり、分離株はすべて cefixime 感受性菌<sup>18)</sup>であったが、2001年において急激な感受性の低下が観察され2002年にも引き続き耐性化が認められた。その他の経口セファロスポリン剤についても同様の傾向であった。静注セファロスポリンのうち、海外で繁用されている ceftriaxone の MIC は、検討期間を通じて1株以外 $0.25\mu\text{g}/\text{m}\ell$  以下であるが、2001年および2002年の菌株では1999年から2000年の菌株に比較して MIC の上昇が認められた。特に、2002年には、ceftriaxone の MIC  $0.5\mu\text{g}/\text{m}\ell$  の菌株の出現が観察されており、今後の臨床分離株の ceftriaxone の感受性に注意する必要がある。米国では、合併症のない淋菌感染症には cefixime 400mg の1回投与が行われ<sup>1)</sup>、優れた有用性が報告されている<sup>21)22)</sup>。さらに、1990年後半より cefixime が使用されているにも関わらず、cefixime に対する感受性の変化は今日においても認められず、MIC<sub>90</sub>は $0.06\mu\text{g}/\text{m}\ell$  と報告されている<sup>22)</sup>。一方、日本においては、ニューキノロン剤と同様に経口セファロスポリン剤の分割、連日投与が行われており、低濃度の薬剤への淋菌の曝露がセファロスポリンの感受性の低下をもたらしたのかもしれない。

Spectinomycin については、2001年の菌株のうち1株が MIC  $256\mu\text{g}/\text{m}\ell$  を示し、spectinomycin 耐性菌の出現が観察された。日本では、経口剤が主に淋菌感染症の治療に用いられていたことより、筋肉注射の必要のある spectinomycin の使用頻度が低かったための耐性菌の頻度が低いことに関連しているものと思われる。しかしながら、ニューキノロン剤および経口セファロスポリン剤耐性により spectinomycin の使用が臨床増加することが予想されることから、spectinomycin に対する感受性の変化にも注意する必要がある。

今回の検討にて、2001年より淋菌臨床分離株において経口セファロスポリン剤耐性が観察された。そこで、2001年の菌株内70株を対象としてセファロスポリン剤耐性機序を探るため *penA* 遺伝子の解析を行った。ペニシリン感受性株の PBP 2 と比較して臨床分離菌株23株で PBP 2 にアスパラギン酸 (Asp-345a) の挿入が認められ、47株において *N. cinerea* と *N. perflava* の PBP 2 から再構成したモザイク様構造の PBP 2 がみられた。PBP 2 へのアスパラギン酸 (Asp-345a) の挿入は、染色体性ペニシリン耐性の最初の段階で起きる変化と考えられている。また、PBP 2 へのアスパラギン酸 (Asp-345a) の挿入された菌株では、ペニシリンおよびセファロスポリンの感受性への影響は不明であるが、他のアミノ酸の変化も観察された。*Neisseria* 属の菌種間での遺伝子の組み替えによるモザイク様構造の PBP 2 は、ペニシリン耐性 *Neisseria meningitidis*<sup>23)</sup>、*N. gonorrhoeae*<sup>16)24)</sup>、*Neisseria lactamica*<sup>25)</sup> や *Neisseria mucosa*<sup>25)</sup> で報告されている。内因性にペニシリンに対する感受性が低い *Neisseria flavescens* や *N. cinerea* が遺伝子組み替えのための *penA* 遺伝子の供給者となることが多い<sup>24)26)</sup>。報告されたモザイク様構造の

*penA* 遺伝子を持つ淋菌は、米国で2株が分離されており、*N. flavescens* の *penA* 遺伝子の一部のみを有するものと *N. flavescens* と *N. cinerea* のそれぞれの *penA* 遺伝子の一部を有するものであった<sup>24)</sup>。これらの PBP 2 のアミノ酸配列は、今回観察されたアミノ酸配列とは異なっていた。しかし、最近報告された日本で分離された cefixime 低感受性淋菌臨床分離株では、83番アミノ酸を除き他のアミノ酸配列は今回観察されたものと同であった<sup>14)</sup>。今回の検討も含めこれらのモザイク様構造の PBP 2 は、遺伝子変異や遺伝子の挿入などにより生み出されるのではなく *Neisseria* 属の菌種間での遺伝子の組み替えにより生じたものと思われる。

モザイク様構造の PBP 2 を有する菌株は、アスパラギン酸 (Asp-345a) の挿入された菌株に比較してペニシリンおよびセファロスポリン剤に対して有意の感受性の低下が認められた。しかしながら、両者の penicillin G の MIC 分布は重なっており、ペニシリン耐性には PBP 2 の変化のみならず porin 関連の *penB* 遺伝子座あるいは薬剤の排泄系の *mtr* 座の変異が関与しているものと思われる。一方、モザイク様構造の PBP 2 を持つ菌株は、著しく経口セファロスポリン剤に低感受性を示し、モザイク様構造の PBP 2 を持つ菌株に対する cefixime あるいは cefdinir の MIC ほとんどあるいはすべてが、 $0.25\mu\text{g}/\text{m}\ell$  以上であるのに対して、そうでない菌株に対する MIC は、 $0.125\mu\text{g}/\text{m}\ell$  以上であり、PBP 2 の構造変化により MIC はほぼ2分された。PBP 2 のモザイク様構造変化が、経口セファロスポリン剤感受性の低下に重要な役割を果たしていることを示唆している。モザイク様構造の PBP 2 を持つ菌株の大部分は、経口セファロスポリン剤の中で最も淋菌に対して抗菌活性が高いとされる cefixime に対して $0.5\mu\text{g}/\text{m}\ell$  以上の MIC を示しており、臨床 cefixime を含め経口セファロスポリン剤による治療が困難なレベルに達している<sup>27)28)</sup>。これらの菌株に対する ceftriaxone の MIC は、なお感受性の範囲内に留まっているが、感受性の低下は認められることより今後の注意が必要である。

前述のように、今回の検討で、日本では淋菌感染症の治療のためにペニシリンおよびテトラサイクリンはほとんど使用されていないにも関わらず、2001年より染色体性ペニシリン耐性および染色体性テトラサイクリン耐性淋菌の著しい増加が観察された。染色体性ペニシリン耐性およびテトラサイクリン耐性については、*penA* 遺伝子<sup>9)</sup>、*penB* 遺伝子座<sup>9)</sup>および *mtr* 遺伝子座<sup>10)</sup> の関与が報告されており、今回は *penA* 遺伝子のみを検討ではあるが、*penA* 遺伝子の変異とともに他の要因が耐性に関与することが示唆された。ニューキノロン剤耐性には *gyrA* 遺伝子および *parC* 遺伝子の関与が報告され異なった耐性機序が関与する<sup>12)13)</sup>。しかしながら、ニューキノロン剤耐性淋菌臨床分離株では、感受性株に比較してペニシリン、テトラサイクリンまたはセファロスポリン剤にも感受性の低下が観察されている<sup>13)</sup>。その機序としては、淋

菌のニューキノロン剤への曝露は、標的酵素をコードする *gyrA* 遺伝子および *parC* 遺伝子の変異をもたらすのみならず、細菌の菌体内への薬剤の透過性の変化および菌体内からの薬剤の汲み出しの変化をもたらし、ニューキノロン剤以外の系統の抗菌剤にも感受性の変化がもたらされるものと考えられる<sup>29)30)</sup>。染色体性ペニシリン耐性および染色体性テトラサイクリン耐性淋菌の著しい増加は、このようなニューキノロン剤の使用に伴うニューキノロン剤耐性化とも関連しているのかもしれない。

今回、モザイク様構造の PBP 2 を持つ菌株の PFGE による遺伝子学的類似性を検討したが、47 株中同一の PFGE プロフィールを示した 26 株を含め 37 株 (78.7%) が 90% 以上の類似性を示した。これら菌株は、共通の祖先を持つものと思われた。残りの菌株についても同一の PFGE プロフィールを示す菌株の組み合わせが認められた。また、北九州で観察された経口セファロスポリン低感受性淋菌の PFGE 解析の結果においても同一クローンの流行であることが確かめられている<sup>6)</sup>。さらに、東京で分離されたセファロスポリン低感受性淋菌の PBP 2 が、今回の観察されたモザイク様構造の PBP 2 とほぼ同一である<sup>14)</sup>ことなどから、日本に増加し始めた経口セファロスポリン低感受性淋菌は、限られた数のクローンのアウトブレイクと考えられる。*Neisseria* 属の多くの菌種は口腔内の常在菌であり、性行為の多様化による oral sex などにより淋菌と他の *Neisseria* 属の菌種との混在がおり、経口セファロスポリン剤の投与が菌種間での *penA* 遺伝子の組み替えを引き起こし、さらに、モザイク様構造の PBP 2 を持ちセファロスポリン剤に低感受性の幾つかのクローンを選択したものと思われる。さらに、経口セファロスポリン剤の繁用がその流行を促進しているものと推測される。

## 結 語

1999 年から 2002 年に男子尿道炎患者から得られた淋菌臨床分離菌の各種抗菌剤への感受性は著しく変化し、ペニシリン剤、セファロスポリン剤およびニューキノロン剤への著明な耐性化が認められた。特に、2001 年より経口セファロスポリン剤に対する感受性は急激に低下しており、その耐性機序として淋菌と他の *Neisseria* 属の菌種との間での *penA* 遺伝子の組み替えによる PBP 2 のモザイク様構造への変化によるものと思われた。このような淋菌の出現および増加は、限られた数のクローンのアウトブレイクと考えられた。現状においては、淋菌感染症に対してはニューキノロン剤および経口セファロスポリン剤による治療は困難であり、抗菌活性が維持されている ceftriaxone あるいは spectinomycin を推奨される用法・用量で使用することが望ましい。また、今後も臨床検体から分離される淋菌の各種薬剤に対する感受性のモニタリングを継続的に行うことが重要であり、その結果により淋菌感染症を効果的に治療するための抗菌剤の選択の変更を行わなければならない。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました岐阜大学医学部臓器病態学講座泌尿器病態学分野 出口隆教授に深甚なる謝意を表します。また、淋菌臨床分離株の収集と解析にご協力いただきました旗崎恭子氏をはじめとする岐阜大学医学部泌尿器科学教室員、関連病院諸兄および関係諸氏、並びに本研究にご指導およびご協力いただきました岐阜大学大学院医学研究科再生医科学専攻微生物・バイオインフォマティクス部門 江崎孝行教授、河村好章助教授に感謝致します。

## 文 献

- Centers for Disease Control and Prevention: Guidelines for treatment of sexually transmitted diseases 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **51**(RR 06), 1-80 (2002)
- Joly-Guillou ML, Lasry S: Practical recommendations for the drug treatment of bacterial infections of the male genital tract including urethritis, epididymitis and prostaticitis. *Drugs* **57**, 743-750 (1999)
- Deguchi T, Yasuda M, Saito I, Kawada Y: Quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Chemother* **3**: 73-84 (1997)
- 日本性感染症学会: 淋菌感染症. 性感染症 診断・治療ガイドライン 2002年版. 東京, 性の健康医学財団, 2002. 20-27.
- Akasaka S, Muratani T, Yamada Y, Inatomi H, Takahashi K, Matsumoto T: Emergence of cephem- and aztreonam-high-resistant *Neisseria gonorrhoeae* that does not produce beta-lactamase. *J Infect Chemother* **7**, 49-50 (2001)
- Muratani T, Akasaka S, Kobayashi T, Yamada Y, Inatomi H, Takahashi K, Matsumoto T: Outbreak of cefazopran (penicillin, oral cepheps, and aztreonam) - resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 3603-3606 (2001)
- Dillon JR, Duck P, Thomas DY: Molecular and phenotypic characterization of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* from Canadian sources. *Antimicrob Agents Chemother* **19**, 952-957 (1981)
- Brannigan JA, Tirodimos IA, Zhang QY, Dowson CG, Spratt BG: Insertion of an extra amino acid is the main cause of the low affinity of penicillin-binding protein 2 in penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* **4**, 913-919 (1990)
- Gill MJ, Simjee S, Al-Hattawi K, Robertson BD, Easmon CS, Ison CA: Gonococcal resistance to beta-lactams and tetracycline involves mutation in loop 3 of the porin encoded at the *penB* locus. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 2799-803 (1998)
- Hagman KE, Pan W, Spratt BG, Balthazar JT, Judd RC, Shafer WM: Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to an-

- timicrobial hydrophobic agents is modulated by the *mrRCDE* efflux system. *Microbiology* **141**, 611–622, (1995)
- 11) Morse SA, Johnson SR, Biddle JW, Roberts MC: High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal *tetM* determinant. *Antimicrob Agents Chemother* **30**, 664–670 (1986)
  - 12) Deguchi T, Yasuda M, Asano M, Tada K, Iwata H, Komeda H, Ezaki T, Saito I, Kawada Y: DNA gyrase mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 561–563, (1995)
  - 13) Deguchi T, Yasuda M, Nakano M, Ozeki S, Ezaki T, Saito I, Kawada Y: Quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*: correlation of alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV with antimicrobial susceptibility profiles. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 1020–1023 (1996)
  - 14) Ameyama S, Onodera S, Takahata M, Minami S, Maki N, Endo K, Goto H, Suzuki H, Oishi Y: Mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 gene (*penA*) in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 3744–3749 (2002)
  - 15) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Approved standard M100-S8. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 1998.
  - 16) Spratt BG: Hybrid penicillin-binding proteins in penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Nature* **332(6160)**, 173–176 (1988)
  - 17) Unemo M, Berglund T, OlcEn P, Fredlund H: Pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiologic tool for *Neisseria gonorrhoeae*: identification of clusters within serovars. *Sex Transm Dis* **29**, 25–31 (2002)
  - 18) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Ninth Informational Supplement. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. 1999.
  - 19) 出口 隆, 河田幸道, 斉藤 功, 岡崎武二郎, 荒川 創一, 守殿貞夫, 田中正利, 熊澤浄一: 男子尿道炎に対する tosufloxacin tosilate の臨床的検討. *Chemotherapy* **41**, 376–391 (1993)
  - 20) 岡崎武二郎, 町田豊平, 小野寺昭一, 清田 浩: ニュー・キノロン剤耐性淋菌の検出. *日性感染症誌* **4**, 88–95 (1993)
  - 21) Hook III EW, McCormack WM, Martin D, Jones RB, Bean K, Maroli AN: Comparison of single-dose oral gatifloxacin with cefixime for treatment of uncomplicated gonorrhea in men. The STD Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 1843–1845 (1997)
  - 22) Centers for Disease Control and Prevention: Sexually transmitted disease surveillance 2001 supplement: Gonococcal Isolate Surveillance Project (GISP) annual report 2001. Atlanta, Ga, 2001.
  - 23) Spratt BG, Zhang QY, Jones DM, Hutchison A, Brannigan JA, Dowson CG: Recruitment of a penicillin-binding protein gene from *Neisseria flavescens* during the emergence of penicillin resistance in *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 8988–8992 (1989)
  - 24) Spratt BG, Bowler LD, Zhang QY, Zhou J, Smith JM: Role of interspecies transfer of chromosomal genes in the evolution of penicillin resistance in pathogenic and commensal *Neisseria* species. *J Mol Evol* **34**, 115–25, (1992)
  - 25) Lujan R, Zhang QY, Saez Nieto JA, Jones DM, Spratt BG: Penicillin-resistant isolates of *Neisseria lactamica* produce altered forms of penicillin-binding protein 2 that arose by interspecies horizontal gene transfer. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 300–304 (1991)
  - 26) Bowler LD, Zhang QY, Riou JY, Spratt BG: Interspecies recombination between the *penA* genes of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species during the emergence of penicillin resistance in *N. meningitidis*: natural events and laboratory simulation. *J Bacteriol* **176**, 333–337 (1994)
  - 27) Deguchi T, Yasuda M, Yokoi S, Ishida K, Ito M, Ishihara S, Minamidate K, Harada Y, Tei K, Kojima K, Tamaki M, Maeda S: Treatment of uncomplicated gonococcal urethritis by double-dosing of 200mg cefixime at a 6-h interval. *J Infect Chemother* **9**, 35–39 (2003)
  - 28) 前田真一, 久保田恵章, 玉木正義, 安田 満, 出口 隆: 男子淋菌性尿道炎に対するセフィキシム400 mg, 分2,3日間投与の細菌学的効果の検討. *日性感染症誌*. **14**, 121–124, (2003)
  - 29) Nikaido H: Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**, 382–388 (1994)
  - 30) Deguchi T, Saito I, Tanaka M, Sato K, Deguchi K, Yasuda M, Nakano M, Nishino Y, Kanematsu E, Ozeki S, Kawada Y: Fluoroquinolone treatment failure in gonorrhea. Emergence of a *Neisseria gonorrhoeae* strain with enhanced resistance to fluoroquinolones. *Sex Transm Dis* **24**, 247–250 (1997)