

【原著・基礎】

男子淋菌性尿道炎由来 *Neisseria gonorrhoeae* の各種抗菌薬に対する感受性と
cefixime 低感受性株 *penA* 遺伝子の解析小野寺昭一¹⁾・清田 浩²⁾・遠藤 勝久³⁾・伊藤 博之⁴⁾・細部 高英⁵⁾
讃岐邦太郎³⁾・吉田 正樹¹⁾・高倉真理子⁶⁾・高畑 正裕⁶⁾¹⁾ 東京慈恵会医科大学感染制御部*²⁾ 東京慈恵会医科大学附属青戸病院泌尿器科³⁾ JR 東京総合病院泌尿器科⁴⁾ 公田クリニック⁵⁾ 細部医院⁶⁾ 富山化学工業株式会社総合研究所

(平成 22 年 8 月 30 日受付・平成 22 年 9 月 17 日受理)

男子淋菌性尿道炎由来 *Neisseria gonorrhoeae* において、2000 年頃より cefixime (CFIX) など経口セフェム系薬に対する感受性が低下する傾向が認められ、これらの株では PBP2 (PenA) の構造遺伝子 *penA* の塩基配列がモザイク様に変異しているとの報告が多数ある。今回、東京慈恵会医科大学附属病院ならびに首都圏の関連施設で分離された新鮮臨床株(2009 年株)の各種抗菌薬に対する薬剤感受性を測定し、1999 年、2003 年および 2006 年分離株の成績と比較するとともに、新たに確認された CFIX 低感受性株における *penA* 遺伝子の塩基配列を解析した。その結果、CFIX に対する感受性率は 2006 年まで 96.6% 以上で推移していたが、2009 年株では 47.4% に低下していた。注射セフェム系薬、ceftriaxone に対する感受性率は、いずれの年度も 100% であったが、2009 年株では MIC 累積分布の低感受性化傾向が認められた。Spectinomycin に対しては、いずれの年度も感受性率は 100% であった。Levofloxacin に対する 2009 年株の感受性率は 5.3% であり、2006 年株の 17.0% より、耐性化がさらに進行していた。2009 年分離 CFIX 低感受性株の *penA* 遺伝子はこれまでの報告と同様、他の *Neisseria* 属菌種である *Neisseria perflava/sicca* または *Neisseria flavescens* の *penA* 遺伝子に近似したモザイク変異を含むことが認められた。

今回検討した 2009 年株の日本性感染症学会のガイドラインで推奨されている薬剤に対する感受性率は 100% であったが、経口および注射セフェム系薬では低感受性化の傾向が認められ、今後も継続したサーベイランスの必要性が示唆された。

Key words: mosaic, *penA*, susceptibility, cefixime, *Neisseria gonorrhoeae*

淋菌感染症は sexually transmitted diseases (STD) として、性器クラミジア感染症と並び、臨床的に頻度の高い感染症である¹⁾。治療の中心であった、ペニシリンやテトラサイクリンに対する耐性菌の出現後は経口セフェム系薬やフルオロキノロン系薬が使用されてきた。しかしながら、1990 年代後半より、これらの薬剤に耐性を示す男子淋菌性尿道炎由来 *Neisseria gonorrhoeae* が増加し、臨床的に大きな問題になっている²⁻⁶⁾。フルオロキノロンは耐性株の著しい増加のため、日本においては淋菌感染症の治療に推奨されておらず、米国においても 2007 年、治療薬リストから除外された⁷⁾。また、2000 年頃より出現した cefixime (CFIX) 低感受性の *N. gonorrhoeae* は、現在、臨床分離株の 30% ほどに達しているとの報告もあり、これら薬剤が担ってきた治療選択肢を奪っている^{5,8)}。この

ような背景から、現在、日本の性感染症診断・治療ガイドラインで推奨されている薬剤は、注射セフェム系薬の ceftriaxone (CTRX)、cefodizime (CDZM) および注射アミノグリコシド系薬 spectinomycin (SPCM) の非経口抗菌薬 3 剤となっている¹⁾。

本邦で *N. gonorrhoeae* における経口セフェム系薬低感受性化が確認され始めた頃より、われわれはその低感受性化の要因を検討し、これらの菌では PBP2 の構造遺伝子である *penA* の塩基配列がモザイク様に変異し、PenA (PBP2 蛋白) の構成アミノ酸が変化していることを認めた^{9,10)}。経口セフェム系薬低感受性化の傾向は、これ以後、国内また海外で多数の報告がなされ、*N. gonorrhoeae* の *penA* 塩基配列がモザイク変異していることも報告されている¹¹⁻¹³⁾。また、*penA* 遺伝子のモザ

Table 1. Oligonucleotide primer used in this study

Oligonucleotide Primer	Sequence
F1	5'-TCGGGCAATACCTTTATGGTGAACAT-3'
F2	5'-GAACGCCTGTCCGAGCTTGTC-3'
F3	5'-ACAAGGCGGTGCAATACCATC-3'
F4	5'-TATACCGCACTGACGCACGAC-3'
F5	5'-GACAGTTGCATGCTGGAGA-3'
F6	5'-TACTGCTGGTGCGGTAGATG-3'
R1	5'-ACAACGGCGGGGGATATAACT-3'
R2	5'-AACGCCCGTTGACGAACCTGC-3'
R3	5'-CATCGCGCACGGGAGACGGTC-3'
R4	5'-GCGAAAGTTCCAAACCTTCCT-3'
R5	5'-CCGTCATGGGTCAAGACAGTA-3'

イク様変異より PenA のアミノ酸配列の変化は幾種かのパターンにわかれることが報告されており^{6,13,14}、このうち最も一般的なものはパターン X とされ、これまでわれわれが報告してきた、他の *Neisseria* 属菌種である *Neisseria perflava/sicca* または *Neisseria flavescens* の PenA に近似したモザイク変異を含むものである^{9,10}。

今回、2008年11月～2009年4月に分離された新鮮臨床株(2009年株)の薬剤感受性を測定し、これまでの感受性成績と比較するとともに、新たに確認された CFIX 低感受性株における PenA のアミノ酸変異を調べた。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

東京慈恵会医科大学附属病院ならびに首都圏の関連施設で1999年、2003年、2006年および2009年に分離された男子淋菌性尿道炎由来 *Neisseria gonorrhoeae* のそれぞれ、41株、58株、47株および38株を用いた。臨床検体は Modified Thayer-Martin selective agar (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社 BD, 東京) に植菌し、Bio-Bag environmental chamber (type C, BD) に封入して同定施設に移送した後、5% CO₂ 下で 35°C、20 時間培養した。培養後、Gram 染色、oxidase tests および catalase tests を実施した。さらに Chocolate II agar (BD) に生育させ、Gonocheck-II kit (EY Laboratories, San Mateo, CA) で同定を行った。分離した *N. gonorrhoeae* はスキムミルク中で -80°C にて保存した。これら分離株の β -lactamase 産生は β -check (Nippon Bio-Supp. Center, 東京) で確認した。

2. 使用薬剤

Penicillin G (PCG, 明治製菓株式会社, 東京), clavulanic acid/amoxicillin (CVA/AMPC, グラクソ・スミスクライン株式会社, 東京), cefixime (CFIX, アステラス製薬株式会社, 東京), ceftiofur (CFTM, 富山化学工業株式会社, 東京), ceftriaxone (CTRX, 中外製薬株式会社, 東京), cefodizime (CDZM, 杏林製薬株式会社, 東京), aztreonam (AZT, エーザイ株式会社, 東京), spectinomycin (SPCM, シグマ アルドリッチ ジャパン株式会

社, 東京), levofloxacin (LVFX, 第一三共株式会社, 東京), azithromycin (AZM, ファイザー株式会社, 東京), tetracycline (TC, シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社) を用いた。

3. 薬剤感受性の測定

各年度臨床分離株を Chocolate II agar 平板培地に植菌し、5% CO₂ 下で 35°C、20 時間培養した後、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のガイドライン¹⁵に基づき、1% Iso VitaleX (BD) を含む GC agar base (BD) を用いた寒天平板希釈法にて MIC を測定した。接種菌量は 10⁴ colony forming unit (CFU) /spot とし、5% CO₂ インキュベーターで 35°C、20 時間培養し、肉眼的に生育の認められない最小濃度を MIC とした。また、CLSI の MIC Interpretive Standards¹⁶に基づき、各年度、各薬剤感受性率を算出した。なお、LVFX については設定がないため、ofloxacin (OFLX) の MIC Interpretive Standards を参考に設定した。

4. CFIX 低感受性 *N. gonorrhoeae* の *penA* 遺伝子の解析

2009年分離の CFIX 低感受性 (MIC : 0.5 μ g/mL および 1 μ g/mL) の 10 株 (NG-130, 132, 135, 136, 137, 143, 146, 142, 139, 148) について *penA* 遺伝子を解析した。Modified Thayer-Martin Agar 上で 23 時間、35°C 5% CO₂ 下で培養した。生育した菌を 100 μ L の溶菌液 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% triton-X) に懸濁させた後、100°C 10 分加熱後 15,000 \times g で 10 分間遠心し、その上清を PCR の template とした。*penA* 遺伝子の全長を、これまでの報告^{9,10}に基づき、oligonucleotides primer の F1 (forward sequences) と R1 (reverse sequences) (Table 1), および Ex Taq polymerase (タカラバイオ株式会社, 大津) を用い PCR で増幅した。PCR は 94°C、2 分間の変性の後、94°C、30 秒の変性、55°C、30 秒のアニーリング、72°C、3 分間の伸長を 30 サイクル行った後、最後に 72°C、1 分間の伸長の条件で行った。増幅された *penA* 遺伝子の解析は oligonucleotides の F1, F2, F3, F4, F5, F6 および R1, R2, R3, R4, R5

Table 2. Antibacterial activity of agents against clinical *N. gonorrhoeae* isolates

Antibacterial agent	1999 (n = 41)			2003 (n = 58)		
	MIC ₅₀ (μ g/mL)	MIC ₉₀ (μ g/mL)	MIC range (μ g/mL)	MIC ₅₀ (μ g/mL)	MIC ₉₀ (μ g/mL)	MIC range (μ g/mL)
PCG	ND	ND	ND	1	4	0.03-4
CVA/AMPC	ND	ND	ND	0.5	1	0.03-2
CFIX	0.008	0.03	0.002-0.125	0.03	0.5	0.002-0.5
CFTM	0.06	0.125	0.002-0.5	0.125	0.5	0.008-1
CTRX	0.008	0.015	$\leq 0.001-0.06$	0.03	0.125	0.002-0.125
CDZM	0.03	0.06	0.002-0.25	0.03	0.125	0.002-0.125
AZT	0.25	0.5	0.06-8	0.25	4	0.03-8
SPCM	8	16	4-16	8	16	2-16
LVFX	0.5	8	0.002-16	4	8	0.004-16
AZM	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TC	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Antibacterial agent	2006 (n = 47)			2009 (n = 38)		
	MIC ₅₀ (μ g/mL)	MIC ₉₀ (μ g/mL)	MIC range (μ g/mL)	MIC ₅₀ (μ g/mL)	MIC ₉₀ (μ g/mL)	MIC range (μ g/mL)
PCG	1	4	0.06-64	1	4	0.06-4
CVA/AMPC	0.5	1	0.06-2	1	2	0.125-4
CFIX	0.06	0.125	0.004-0.25	0.5	0.5	0.008-1
CFTM	0.125	0.5	0.004-1	0.25	0.5	0.004-1
CTRX	0.03	0.06	0.002-0.125	0.06	0.125	0.004-0.25
CDZM	0.06	0.125	0.002-0.125	0.06	0.25	0.004-0.5
AZT	0.5	4	0.031-8	4	16	0.125-16
SPCM	16	16	4-16	16	16	8-32
LVFX	4	8	0.004-16	8	8	0.002-16
AZM	0.25	0.5	0.008-1	0.25	1	0.008-8
TC	1	2	0.06-16	1	4	0.125-32

Shading shows antibacterial activity of oral and parenteral cephem antibiotics and monobactam antibiotic.

Table 3. Percentage of susceptible strains of antibacterial agents in clinical *N. gonorrhoeae* isolates

Antibacterial agent	Breakpoint MIC (μ g/mL) ^a	Percentage of susceptible strains in			
		1999 (41) ^b	2003 (58)	2006 (47)	2009 (38)
PCG	0.06	N.D.	1.7	4.3	10.5
CFIX	0.25	100	96.6	100	47.4
CTRX	0.25	100	100	100	100
SPCM	32	100	100	100	100
LVFX ^c	0.125	41.5	17.2	17.0	5.3

^a: CLSI, ^b: No. of strains, ^c: Assumed from OFLX breakpoint MIC

(Table 1) を用い^{9,10)}, Dragon Genomics Center (タカラバイオ株式会社, 四日市) にて行った。遺伝子の解析結果はアミノ酸に置換し, *N. gonorrhoeae* LM306 (ペニシリン感受性株; GenBank accession no. M32091), NG-3 (2001年に分離されたCFIX低感受性株; GenBank accession no. AB071984) および NG-122 (2006年に分離されたCFIX低感受性株) の PenA と比較した。また, 他の *Neisseria* 属である *N. perflava/sicca* 1654/1659 (GenBank accession no. X76422), *N. flavescens* NCTC 8263 (GenBank accession no. M26645), *Neisseria cinerea* NCTC 10294 (GenBank accession no. X59540) の PenA

との比較を行った。

II. 結 果

1. 薬剤感受性

1999年から3~4年間隔の1999年, 2003年, 2006年および2009年の各年度臨床分離株における薬剤感受性を Table 2 に, また, 各薬剤に対する感受性率を Table 3 に示す。なお, β -lactamase 産生株の割合は1999年; 1/41株: 2.4%, 2003年; 3/58株: 5.2%, 2006年; 2/47株: 4.3%, 2009年; 0/38株: 0%であった。

1999年にはすでにキノロン耐性菌の存在が認められ, LVFX の MIC₉₀ 値は 8 μ g/mL と高かった。一方, 経口セ

LM306	MLIKSEYKPRMLPKEEQVKKPMTSNGRISFVLMAMAVLFAELIARGLYLQVTYTNFLKEQGDNRIVRTQALPATRGTVSDRNGAVLALSAPTESLFAVPKDKMKEMPSAAQLERLSELVDV	120
NG-142	-----	E
NG-139	-----	E
NG-122	-----	E
NG-130	-----	E
NG-132	-----	E
NG-3	-----	E
LM306	PVDVLRNKLEQKGSFIIWKRLQDPKVAEEVKALGLENFVFEKELKRHYPMGNLFAHVIGFTDIDGKGQEGLELSLEDSLYGEDGAEVVLDRDROGNI VDSLSPRNKAPQNGKDIILSLD	240
NG-142	-----	A S HAGE E
NG-139	-----	A S HAGE E
NG-122	-----	A S HAGE E
NG-130	-----	A S HAGE Q
NG-132	-----	A S HAGE E
NG-3	-----	A S HAGE E
LM306	QRILQTLAYEELNKAVEYHQAKAGTVVVL DARTGEI LALANTPAYDPNRPGRADSEQRNRRAVTDMI EPGSAIKPFVIAKALDAGKTDLNERLNTQPYKIGPSVPR-DTHVYPSLDVIRGIM	359
NG-142	-----	V E K Q M T S V-ATDF L SAT-Q T
NG-139	-----	V E K Q M T S V-ATDF L SAT-Q T
NG-122	-----	V E K Q M T S V-ATDF L SAT-Q T
NG-130	-----	V E K Q M T S V-ATDF L SAT-Q T
NG-132	-----	V E K Q M T S V-ATDF L SAT-Q T
NG-3	-----	V E K Q M T S V-ATDF L SAT-Q T
LM306	QKSSNVGTSKLSARFGAEEMDFYHELGI GVRMHSGFPGETAGLLRNRWRWP I EQATMSFGYGLQLSLLQLARAYTAL THDGVLLPLSFEKQAVAPQGR I FKESTAREVRLMVSVTE	479
NG-142	-----	M-TPK D-V S QK V E V K VI-A KK-E
NG-139	-----	M-TPK D-V S QK V E V K VI-A KK-E
NG-122	-----	M-TPK D-V S QK V E V K VI-A KK-E
NG-130	-----	M-TPK D-V S QK V E V K VI-A KK-E
NG-132	-----	M-TPK D-V S QK V E V K VI-A KK-E
NG-3	-----	M-TPK D-V S QK V E V K VI-A KK-E
LM306	PGGTGTAGAVDGFVAGKGTARKFVNGRYADNKHVATFI GFAPAKNPRV I VAVTI DEPTAHGYGGVAVGPPFKKIMGGSLLI LGI SPTKPLT-AAAVKTPS*	581
NG-142	A-----	L V-Y N SS *
NG-139	A-----	L V-Y N S *
NG-122	A-----	L V-Y N S *
NG-130	A-----	L V-Y N S T V QV V NV *
NG-132	A-----	L V-Y N S T V QV V NV *
NG-3	A-----	L V-Y N S T V QV V NV *

Fig. 1. Amino acid sequences of *N. gonorrhoeae* PenA with reduced cefixime susceptibility isolated in 2009 and before. LM306: penicillin-susceptible strain, NG-142, NG-139, NG-130 and NG-132 (isolated in 2009), NG-122 (isolated in 2006) and NG-3 (isolated in 2001): the mosaic-like strain with reduced cefixime susceptibility. Active sites of serine residue (SXXK, SXN and KTG)-conserved motifs are indicated by underlining. Dashes indicate amino acid residues identical to those of LM306. Asterisks are stop codons.

フェム系薬のCFIX, CFTMの1999年分離株に対するMIC₅₀, MIC₉₀値はともに低く (Table 2), CFIXに対する感受性率は100%であった (Table 3)。また, 注射セフェム系薬のCTRXに対する感受性率も100%であったが, モノバクタム系注射薬AZTに対しては, すでに感受性の低い株が含まれていた (Tables 2, 3)。2003年になるといずれのβ-ラクタム系薬もMIC rangeの高濃度域への拡がりやMIC₉₀値の上昇が認められた。また, LVFXではMIC₅₀値のさらなる上昇が認められた。2006年分離株の感受性は2003年分離株と比較していずれの薬剤も大きな感受性の低下は認められなかった。しかし, 2009年株の感受性は2006年度と比較すると, 経口セフェム系薬 (CFIX) および注射セフェム系薬 (CTRX, CDZM) における感受性の低下がみられた。即ち, CFIX, CDZMのMIC₉₀値がそれぞれ4倍および2倍に, CFIX, CTRX, CDZMのMIC range上限値がそれぞれ4倍, 2倍, 4倍に増大していた (Table 2)。経口セフェム系薬, CFIXに対する2006年までの感受性率は96.6%以上で推移していたが, 2009年分離株では47.4%に低下した (Table 3)。2009年分離株に対して, 注射セフェム系薬, CTRX

はMIC分布で低感受性化傾向が認められるものの, 感受性率は依然100%であった。SPCMに対しては1999年から2009年までの分離株で大きな感受性の変化は認められず, 感受性率は100%であり, SPCM耐性菌の出現は当該施設では認められなかった。LVFXに対しては感受性率が1999年には41.5%であったが, 年々低下し, 2009年度は5.3%と耐性化がさらに進行していた (Table 3)。

2. CFIX低感受性*N. gonorrhoeae*のPenA蛋白の変異と薬剤感受性

2009年分離CFIX低感受性10株のPenAはすべての株でモザイク様変異が認められた。変異アミノ酸の種類はほとんど同一であったが, A549以降にモザイク変異がないもの (I型) とあるもの (II型) の違いで2パターンに分かれた。10株中3株 (NG-142, 139, 148) がI型, 7株 (NG-130, 132, 135, 136, 137, 143, 146) がII型であった。Fig. 1に今回分離された株のうち, I型のNG-142, NG-139, II型のNG-130, NG-132におけるアミノ酸配列を示す。

I型は2008年にわれわれが報告したNG-122 (2006年

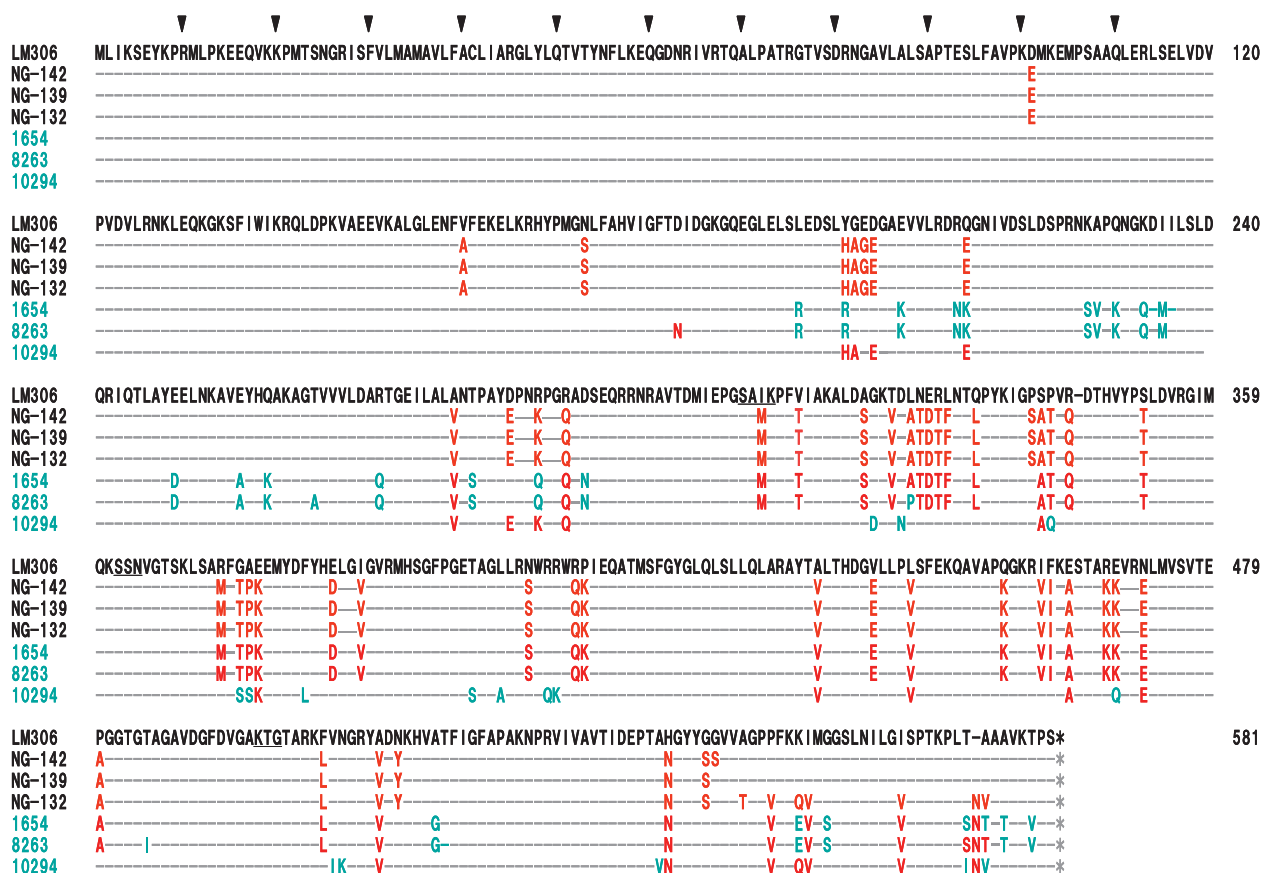


Fig. 2. Amino acid sequences of *N. gonorrhoeae* and other *Neisseria* spp. PenA.

LM306: penicillin-susceptible strain, NG-142, NG-139 and NG-132: the mosaic-like strain with reduced cefixime susceptibility isolated in 2009, 1654: *N. perflava/sicca* 1654/1659, 8263: *N. flavescens* NCTC 8263, 10294: *N. cinerea* NCTC 10294. Active sites of serine residue (SXXK, SXN, and KTG)-conserved motifs are indicated by underlining. Dashes indicate amino acid residues identical to those of LM306. Asterisks are stop codons.

分離菌), II型は2002年に報告したCFIX低感受性株NG-3(2001年分離菌)とほぼ同一のアミノ酸変異であった(Fig. 1)^{9,10}。なお, II型のNG-130は他の9株でみられたQ214Eの変異がなく, 感受性株と同じアミノ酸(Q)を保有していた。G545S変異はすべての株にみられたが, I型の1株, NG-142ではさらに, これまでに報告のないG546Sの変異が認められた(Fig. 1, GenBank Accession number: AB536877として登録済)。これらCFIX低感受性株のPenAは他の*Neisseria*属の*N. perflava/sicca* 1654/1659(GenBank Accession number: X76422),あるいは*N. flavescens* NCTC 8263(GenBank Accession number: M26645)のPenAに近似しており, いずれの株にも活性中心近傍に*N. gonorrhoeae*には認められない2つのアミノ酸(I312MとV316T)の変異が認められた(Fig. 2)。

PenAの解析を行ったCFIX低感受性10株はすべてLVFXに対して耐性であった(Table 4)。また, CFIXのMIC値は0.5 µg/mLあるいは1 µg/mLであり, セフェム薬感受性のATCC 19424株におけるMIC値(0.001 µg/mL)と比べ, 感受性は1/512-1/1024に低下し

た。これらに対して, CTRXのMIC値は0.03~0.12 µg/mLであり, 比較的良好な抗菌活性を保有していたが, ATCC 19424株のMIC値(0.00025 µg/mL)に比べ感受性は1/128-1/512に低下した。さらに, これまでの報告にみられないG546S変異が認められたNG-142株では, 検討した経口および注射セフェムの4薬剤に対し, 他の9株のセフェム薬低感受性株よりもさらに1-1/16の低感受性を示した(Table 4)。

III. 考 察

1999~2001年当時, 男子尿道炎患者から分離した*N. gonorrhoeae*のキノロン系薬に対する高度耐性化が臨床的に大きな問題になっており, その原因は標的酵素ParC, GyrAの変異であることも報告されていた⁴。また, 同時期, 淋菌感染症治療の重要な選択剤である経口セフェム系薬に対しても, 低感受性を示す*N. gonorrhoeae*の出現が認められ始めていた^{2,3}。東京慈恵会医科大学附属病院ならびに首都圏の関連施設で1999年より開始したわれわれのサーベイランスの成績では, 1999年のCFIXのMIC₉₀値ならびにMIC rangeはそれぞれ0.03 µg/mL, 0.002~0.125 µg/mLであるのに対し, 2003年で

Table 4. Antibacterial activity of agents against clinical *N. gonorrhoeae* isolates with reduced cefixime susceptibility

Strain	MIC ($\mu\text{g/mL}$)						
	PCG	CFIX	CFTM	CTRX	CDZM	SPCM	LVFX
NG-142	4	1	1	0.12	0.5	16	8
NG-139	1	0.5	0.5	0.06	0.12	16	8
NG-148	4	0.5	0.5	0.06	0.25	16	8
NG-130	2	0.5	0.5	0.06	0.12	16	16
NG-132	4	0.5	0.5	0.06	0.12	16	8
NG-135	1	0.5	0.5	0.06	0.12	8	4
NG-136	4	0.5	0.5	0.06	0.12	16	8
NG-137	4	0.5	0.5	0.12	0.25	16	16
NG-143	2	0.5	0.5	0.06	0.06	8	16
NG-146	0.5	0.5	0.25	0.03	0.03	16	4
ATCC 19424	0.004	0.001	0.004	0.00025	0.00025	2	< 0.004

は $0.5 \mu\text{g/mL}$, $0.002\sim 0.5 \mu\text{g/mL}$ と MIC₉₀ 値, MIC range 上限値はそれぞれ 16 倍, 4 倍上昇した。これらの経口セフェム系薬に対する低感受性化のメカニズムは, 当時明らかになっていなかったが, *N. gonorrhoeae* では薬剤排出ポンプの存在が報告されており^{17,18)}, 当初, われわれはキノロン薬耐性に引き続いて起こったセフェム薬低感受性化は, 薬剤排出機能の亢進によるものではないかと考えていた。そこで, *N. gonorrhoeae* の薬剤排出ポンプ, MtrC-MtrD-MtrE efflux pump の *mtrR* 遺伝子発現を RT-PCR 法により検討したが, 明確な結論を得ることができなかった。このため, *N. gonorrhoeae penA* における D345 挿入によるラクタム薬耐性の報告¹⁹⁾に基づき, セフェム薬低感受性株の *penA* 遺伝子を改めて検討したところ, これらは感受性株と異なり, 他の *Neisseria* 属菌種の *penA* に近似した部分を含むモザイク構造であることを認めた⁹⁾。その後, 本邦のみならず, 海外でも多数の同様な報告がなされ, セフェム薬低感受性 *N. gonorrhoeae* の蔓延が確認された^{5,11~14)}。

セフェム薬低感受性株の *penA* 遺伝子のモザイク構造は Fig. 2 に示したように, 他の *Neisseria* 属, 特に *N. perflava/sicca* 1654/1659 あるいは *N. flavescens* NCTC 8263 の *penA* 遺伝子に近似しており, ヒト生体内でこれら菌種遺伝子から *N. gonorrhoeae* への遺伝子導入が起こり, PBP2 がモザイク構造になったものと考えられている⁹⁾。

PBP2 の活性中心は C 末端の transpeptidase ドメインに位置し, 保存配列をもつ 3 つのモチーフ (SXXK, SXN, KTG) が存在する²⁰⁾。SXXK モチーフは, 触媒反応に重要な 2 つのアミノ酸 Ser310 と Lys313 を含んでいる。セフェム系薬に低感受性を与えていると考えられる重要な変異 (I312M と V316T) は, *N. perflava/sicca* または *N. flavescens* からの遺伝子導入と考えられ, SXXK モチーフが関与する活性中心構造に大きな変化を与えているものと示唆された。また, 他のモザイク様変異も活性中心の構造を変化させ, セフェム系薬の低感受性化に影響を与

えているものと考えられた。しかしながら, セフェム薬低感受性株に認められた G545S 変異は, KTG モチーフの下流に位置しているものの, 他の *Neisseria* 属のいずれの菌種もこれを所有しておらず, 本変異は, 薬剤の選択圧による *N. gonorrhoeae* の後天的なものと考えられている¹⁴⁾。

2009 年分離 CFIX 低感受性 10 株の PenA はすべての株でモザイク変異が認められたが 1 株を除いてこれまでわれわれが報告^{9,10)}してきたものと同一であった。これらの株はすべて I312M と V316T 変異を保有し, G545S 変異もまた, いずれの株でも認められた。モザイク変異は A549 以降にモザイク変異がない I 型と, 変異がある II 型の 2 種類に分けられたが (Fig. 1), 両型で感受性にはほとんど差異がないことから, A549 以降のモザイクの有無はセフェム薬低感受性にかかわっていないものと考えられた。また, II 型の NG-130 は他の 9 株でみられた Q214E の変異がなく, 感受性株と同じアミノ酸 (Q) を保有していたが, Takahata らが mosaic-3 のパターンと報告¹⁴⁾しており, 新規な変異ではなかった。しかし, I 型の 1 株 (NG-142) ではこれまでに報告のない G546S の新規な変異が認められた。

2006 年分離株の感受性を 2003 年分離株と比較すると, いずれの薬剤においても MIC₉₀ 値から見ると, 大きな感受性の低下は認められなかった。しかし, 2009 年分離株の感受性は 2006 年と比較すると, 経口セフェム系薬 (CFIX) および注射セフェム系薬 (CTRX, CDZM) に対する感受性の低下が認められた。セフェム薬感受性の全体的な低下はモザイク変異株を中心とする低感受性株の分離頻度の増加によるものと考えられるが, MIC range 上限値の上昇については, 新たなモザイク変異 (G546S) 株の出現などがその原因と考えられた。他方, セフェム薬低感受性化の要因としては, *penA* 以外にも *mtrR*, *porB1b*, *ponA* などの変異に関する報告²¹⁾があり, 今後, これらについても明らかにしていくことが必要と考えられた。

現在、淋菌感染症に対し、フルオロキノロン系薬および経口セフェム系薬による治療は不可能あるいは不十分であるため、抗菌活性が維持されている注射セフェム系薬、CTRX、CDZM、あるいはSPCMを適正な用法・用量で使用することが重要である。日本性感染症学会のガイドラインで推奨されているこれら3薬剤に対する2009年分離株の感受性率はいずれも100%であったが、CTRXおよびCDZMのMIC累積分布では低感受性化傾向が認められており、今後も薬剤感受性、また、PenAの解析などの継続したサーベイランスが必要と考えられた。

文 献

- 1) 性感染症 診断・治療ガイドライン 2008. 日本性感染症学会誌 2008; 19(Supplement): 49-56
- 2) Muratani T, Akasaka S, Kobayashi T, Yamada Y, Inatomi H, Takahashi K, et al: Outbreak of cefozopran (penicillin, oral cepheims, and aztreonam)-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 3603-6
- 3) 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 β -lactamase. *J Infect Chemother* 2001; 7: 49-50
- 4) Tanaka M, Nakayama H, Notomi T, Irie S, Tsunoda Y, Okadome A, et al: Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Japan, 1993-2002: continuous increasing of ciprofloxacin-resistant isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24 (Suppl 1): S15-22
- 5) Ito M, Yasuda M, Yokoi S, Ito S, Takahashi Y, Ishihara S, et al: Remarkable increase in central Japan in 2001-2002 of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with decreased susceptibility to penicillin, tetracycline, oral cephalosporins, and fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3185-7
- 6) Ito M, Deguchi T, Mizutani K, Yasuda M, Yokoi S, Ito S, et al: Emergence and spread of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates harboring mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 in central Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 137-43
- 7) CDC: Update to CDC's sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006: fluoroquinolones no longer recommended for treatment of gonococcal infections. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2007; 56: 332-6
- 8) Ochiai S, Ishiko H, Yasuda M, Deguchi T: Rapid detection of the mosaic structure of the *Neisseria gonorrhoeae penA* gene, which is associated with decreased susceptibilities to oral cephalosporins. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1804-10
- 9) Ameyama S, Onodera S, Takahata M, Minami S, Maki N, Endo K, et al: Mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 gene (*penA*) in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3744-9
- 10) Osaka K, Takakura T, Narukawa K, Takahata M, Endo K, Kiyota H, et al: Analysis of amino acid sequences of penicillin-binding protein 2 in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone. *J Infect Chemother* 2008; 14: 195-203
- 11) Ochiai S, Sekiguchi S, Hayashi A, Shimadzu M, Ishiko H, Matsushima-Nishiwaki R, et al: Decreased affinity of mosaic-structure recombinant penicillin-binding protein 2 for oral cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 54-60
- 12) Wang S A, Lee M V, O'Connor N, Iverson C J, Ohye R G, Whitticar P M, et al: Multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* with decreased susceptibility to cefixime-Hawaii, 2001. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 849-52
- 13) Whiley D M, Limnios E A, Ray S, Sloots T P, Tapsall J W: Diversity of *penA* alterations and subtypes in *Neisseria gonorrhoeae* strains from Sydney, Australia, that are less susceptible to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3111-6
- 14) Takahata S, Senju N, Osaki Y, Yoshida T, Ida T: Amino acid substitutions in mosaic penicillin-binding protein 2 associated with reduced susceptibility to cefixime in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3638-45
- 15) Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard-Eighth Edition. M07-A8. Wayne, PA, 2009
- 16) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement. M100-S20. Wayne, PA, 2010
- 17) Hagman K E, Pan W, Spratt B G, Balthazar J T, Judd R C, Shafer W M: Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the *mtrRCDE* efflux system. *Microbiology* 1995; 141: 611-22
- 18) Veal W L, Nicholas R A, Shafer W M: Overexpression of the MtrC-MtrD-MtrE efflux pump due to an *mtrR* mutation is required for chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 2002; 184: 5619-24
- 19) Brannigan J A, Tirodimos I A, Zhang Q Y, Dowson C G, Spratt B G: 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* 1990; 4: 913-9
- 20) Powell A J, Tomberg J, Deacon A M, Nicholas R A, Davies C: Crystal structures of penicillin-binding protein 2 from penicillin-susceptible and -resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* reveal an unexpectedly subtle mechanism for antibiotic resistance. *J Biol Chem* 2009; 284: 1202-12
- 21) Lindberg R, Fredlund H, Nicholas R A, Unemo M: *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone: association with genetic polymorphisms in *penA*, *mtrR*, *porB1b*, and *ponA*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2117-22

Susceptibility of male gonococcal urethritis-isolated *Neisseria gonorrhoeae*
against antibacterial agents and *penA* gene analysis of strains
with reduced cefixime susceptibility

Shoichi Onodera¹⁾, Hiroshi Kiyota²⁾, Katsuhisa Endo³⁾,
Hiroyuki Ito⁴⁾, Takahide Hosobe⁵⁾, Kunitaro Sanuki³⁾,
Masaki Yoshida¹⁾, Mariko Takakura⁶⁾ and Masahiro Takahata⁶⁾

¹⁾ Department of Infection Control, Jikei University School of Medicine, 3-25-8 Nishishinbashi, Minato-ku, Tokyo, Japan

²⁾ Department of Urology, Jikei University School of Medicine, Aoto Hospital

³⁾ Department of Urology, JR Tokyo General Hospital

⁴⁾ Kuden Clinic

⁵⁾ Hosobe Clinic

⁶⁾ Research Laboratories, Toyama Chemical Co., Ltd.

From about 2000, male gonococcal urethritis-derived *Neisseria gonorrhoeae* strains tend to show reduced susceptibility to oral cephem agents such as cefixime (CFIX). Many reports find the base sequence of the structural gene *penA* of penicillin binding protein (PBP) 2 to be mosaic in these strains.

We measured the susceptibility of 2009 fresh clinical strains isolated in the Tokyo metropolitan area to antibacterial agents, using CLSI broth microdilution method, and comparing it to results for strains isolated in 1999, 2003, and 2006. We also analyzed the base *penA* gene sequence in 10 strains newly confirmed to show reduced CFIX susceptibility.

Results showed that 96.6% or more of strains isolated before 2006 were susceptible to CFIX, compared to only 47.4% of 2009 strains. Although 100% of strains were susceptible to cephem injection, such as ceftriaxone, the distribution of minimum inhibitory concentrations (MICs) of these agents indicated a trend toward reduced susceptibility. The susceptibility to spectinomycin was 100%. The susceptibility of isolates to levofloxacin in 2009 was 5.3%, suggesting further resistance (17.0%: isolates in 2006). For the *penA* gene of strains with reduced CFIX susceptibility, we analyzed mosaic-like *penA* gene changes. As a result, the mosaic-like *penA* gene similar to other *Neisseria* genus species, such as *Neisseria perflava/sicca* or *Neisseria flavescens*, were recognized as in past reports. These mosaic-like changes were divided into two patterns, with or without a mosaic variation after PenA, A549. This mosaic variation was almost the same as we reported. All agents recommended in guidelines by the Japanese Society for Sexually Transmitted Diseases showed susceptibility of 100%, but a trend toward reduced *N. gonorrhoeae* susceptibility to cephem antibiotics is continuing, suggesting the necessity for ongoing observation.