

Neisseria gonorrhoeae における薬剤排出遺伝子の解析

遠藤 優太, 近藤 大樹, 丸山 元輝, 眞野 容子, 古谷 信彦

文京学院大学大学院 保健医療科学研究科

要旨

近年, *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) に対する ceftriaxone (CTRX) の感受性の低下および耐性株の増加が臨床問題となっており, その動向が注目されている. しかし, 日本における *N. gonorrhoeae* の薬剤排出機構に関する報告はほとんどない. よって, 本研究では検査受託センターの関東支部において2005年から2010年に分離された *N. gonorrhoeae* 91株を対象に penicillin G (PCG), cefixime (CFIX), CTRX, spectinomycin (SPCM), tetracycline (TC), ciprofloxacin (CPFX) の計6薬剤の感受性試験を行い, *mtrR* についてシーケンス解析を行った. MIC₅₀ を変異の有無によって群分けすると, セファロスポリン系薬剤の CFIX において 0.06 μ g/mL (変異なし) から 0.25 μ g/mL (変異あり) に上昇した. 変異別にみると Gly-45-Asp と Thr-105-His の同時変異株が 23 株と最も多く, そのうち 19 株において CFIX に対して低感受性または耐性を示すことが認められた. CFIX は経口薬であり静注薬に比べて処方しやすいため, 使用頻度が高くなり非感性株が増加したと考えられた. 本研究では, 今後 CFIX による治療が困難を極めることが示唆された.

キーワード

Neisseria gonorrhoeae, *mtrR*, Cefixime

I. 序論

淋菌感染症の原因菌である *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) は性行為により感染し, 男性では主に尿道炎, 女性では子宮頸管炎を引き起こす. 現在, 厚生労働省が発表している淋菌感染症感染者の報告数の推移では, 淋菌感染症は 2002 年をピークに減少しており, 2010 年頃から横ばい傾向にある¹⁾. *N. gonorrhoeae* は他の菌種に比べ薬剤耐性を獲得しやすく, その薬剤耐性の急激な上昇により淋菌感染症において承認されている治療薬の有効性が低下し, 現在では, マクロライド系, フルオロキノロン系, β -ラクタム系抗菌薬など多数の抗菌薬に耐性を示す多剤耐性淋菌が問題となっている²⁾. なかでもセフェム系抗菌薬の耐性化は, *mtrR* 内の変異によって引き起こされると報告されている²⁾. *mtrR* は *mtrCDE* ファミリーという RND 型薬剤排出システムの抑制に関与する転写調節因子 (リプレッサー: repressor) である³⁾. RND 型薬剤排出システムの構成は内膜貫通ユニット, 外膜貫通ユニット, およびそれらをつないでいるサブユニットからなる薬剤排出機構であり, 多様な薬剤に対する耐性化に関与している³⁾. 本研究では, *N. gonorrhoeae* における抗菌薬感受性と *mtrR* 内における変異の関連性を目的とし, 薬剤感受性試験および *mtrR* 遺伝子のシーケンス解析を行った.

II. 方法

1. 使用菌株

2005 年 11 月から 2010 年 5 月に検査受託センターの関東支部において分離された *N. gonorrhoeae* 91 株を使用した. 使用するまでの期間, -80°C にて冷凍保存した.

2. 使用薬剤

ペニシリン系薬剤の penicillin G (PCG: MP バイオメディカルズジャパン株式会社, 東京), セファロスポリン系薬剤の cefixime (CFIX: シグマアルドリッチジャパン株式会社, 東京), ceftriaxone (CTRX: 藤沢薬品工業株式会社, 東京), アミノグリコシド系薬剤の spectinomycin (SPCM: シグマアルドリッチジャパン株式会社), テトラサイクリン系薬剤の tetracycline (TC: 富士フィルム 和光純薬株式会社, 大阪), フルオロキノロン系薬剤の ciprofloxacin (CPFX: 富士フィルム 和光純薬株式会社) の 6 剤である.

3. 抗菌薬感受性試験

抗菌薬感受性試験は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に準拠し寒天平板希釈法で行った⁴⁾. McFarland 0.5 に菌液を調整後, Muller Hinton Broth で 10 倍希釈し, GC 培地を基礎とした 1% IsoVitale X Enrichment 含有チョコレート寒天培地を 6 薬剤の倍々希釈したものを用いて作成した. その後, 菌液をマイクロプランター (株式会社

佐久間製作所, 東京) で接種し, 37℃・5%炭酸ガス環境下で24時間培養した後, CLSIの基準に基づき判定した⁴⁾.

4. 遺伝子解析

*mtrR*内の変異を調べるため, PCR法およびシーケンス解析による遺伝子解析を行った. 解析に使用するDNA抽出はボイル法を用いた. はじめにTE buffer 150μLに純培養した菌を懸濁し, 100℃・10分加熱後, 13000rpm・5分・4℃の条件で遠心した上清をtemplate (核酸濃度: 30-50ng/μL) とし, *mtrR*プライマー (Forward: AAAACGCCAT-TATGAGAAAA, Reverse: TGTTACCAAAGGCTTGAT-TAT) を用いて, 熱変性: 94℃・1分, アニーリング: 60℃・30秒, 伸長反応: 72℃・1分を35サイクルの反応条件で行った. その後, 2%アガロースゲルを用いて電気泳動 (100V・37分) し, エチジウムブロマイドで15分染色後, UV照射 (benchtop 2UV™ Transilluminator, ビーエム機器株式会社) にてバンドを確認後, シークエンス解析を行い, BLASTを用いてアミノ酸置換を同定した.

III. 結果

1. 抗菌薬感受性試験

6薬剤における感受性試験の結果を示した (表1). ペニシリン系薬剤のPCG, テトラサイクリン系薬剤のTC, フルオロキノロン系薬剤のCPFXにおける耐性株はそれぞれ57株, 69株, 81株であった. セフェム系薬剤のCFIX, CTRXでは耐性が39株, 1株認められ, SPCMでは耐性株は確認されず, 中等度耐性が1株確認された.

2. 遺伝子解析

N. gonorrhoeae 91株における*mtrR*遺伝子の変異の有無によるMIC₅₀とMIC₉₀を示した (表2). CFIXのMIC₅₀において変異を有する株が変異無しの株と比較し2管差高い値を示していた. シークエンス解析の結果, *mtrR*内におけるアミノ酸置換を示した (表3). Gly-45-Asp, Thr-105-His置換が多く認められ, CFIXへの低感受性株の割合が高かった. 新たに, Asp-79-Asn, Thr-86-Alaの置換が確認された.

表1. 抗菌薬感受性試験の結果

Agent	MICs (μg/ml)			Susceptibility profile (n=91)		
	Range	MIC50	MIC90	S	I	R
PCG	0.06-≥16	2	8	2	32	57
CFIX	<0.015-2	0.125	0.5	52	0	39
CTRX	≤0.015-0.5	0.06	0.25	90	0	1
SPCM	≤0.5-64	16	32	90	1	0
TC	≤0.015-≥16	4	8	5	17	69
CPFX	≤0.03-≥8	≥8	≥8	10	0	81

表2. *mtrR* 遺伝子の有無によるMIC₅₀とMIC₉₀

		PCG	CFIX	CTRX	SPCM	TC	CPFX
MIC ₅₀ (n=91)	変異あり (n=45)	2	0.25	0.06	16	4	≥8
	なし (n=46)	4	0.06	0.125	16	8	≥8
MIC ₉₀	変異あり	8	0.5	0.25	32	8	≥8
	なし	8	0.5	0.25	32	8	≥8

表3. *mtrR* 内のアミノ酸置換

	Ala-39	Ala-40	Gly-45	Asp-79	Thr-86	Tyr-105	株数 (%)
変異あり	Thr	—	—	—	—	His	8 (9)
	—	Asp	—	—	Ala	His	6 (7)
	—	—	Asp	—	—	His	23 (25)
	—	Asp	—	Asn	Ala	—	1 (1)
	—	—	—	—	—	His	7 (8)
変異なし	—	—	—	—	—	—	46 (51)

IV. 考察

N. gonorrhoeae は抗菌薬に耐性を獲得しやすく、海外では多剤耐性菌の出現が報告されていることから、今後日本において治療困難な多剤耐性淋菌感染症が増加する可能性が予測されている。JAID/JSC 感染症治療ガイドラインでは TC、フルオロキノロン系薬剤の耐性率は 70-80% と報告されており³⁾、本研究の結果も同様の値となった。また、経口セファロスポリン系抗菌薬の CFIX においても多くの無効例が報告されており³⁾、本研究においても耐性株が 39 株確認された。このことから、これらの抗菌薬は感性和と示された場合のみ推奨すべきである。保険適応を有しかつ淋菌に実際に有効な推奨抗菌薬である CTRX、SPCM の感率率は 95% 以上であり淋菌感染症の治療に有効であることが確認された。しかし、耐性株・中等度耐性株が 1 株ずつ確認されたことから今後、耐性菌の蔓延する可能性が示唆されるため抗菌薬耐性淋菌の動向を調査する必要があると考えられる。

遺伝子解析の結果から、*mtrR* 内に変異を有する株において CFIX の MIC₅₀ が変異を持たない株と比較して 0.06µg/ml から 0.25µg/ml と 2 管差高い値を示し耐性化傾向が見受けられた。CLSI における CFIX のブレイクポイントは 0.25µg/ml であるため、変異の存在が CFIX の耐性化に関与している可能性が示唆された。変異を有する株について比較すると、Gly-45-Asp と Thr-105-His の同時変異株が 23 株と最も多く、そのうち 19 株において CFIX に対して低感受性または耐性を示すことが認められた。それぞれの変異をみると Gly-45-Asp の単独変異は認められず、Thr-105-His の単独変異では 7 株中 3 株のみ耐性化していた。Warner らによると Gly-45-Asp のミスセンス変異は *mtrR* のリプレッサーとしての働きを阻害させることが報告されており⁸⁾、Thr-105-His は *mtrR* の多量体形成に変化を与え機能に影響を与える可能性が示唆されている⁹⁾。これらの既報より、検出された同時変異により *mtrCDE* の過剰発現を引き起こし耐性化につながったと考えられる。ほかに検出された変異として Asp-79-Asn と Thr-86-Ala を有する株が検出されたが、これらの変異を有する株において薬剤感受性との関連はみられなかったため、耐性化に関与している可能性は低いと考えられる。変異を持たない株において CFIX 耐性株が認められた。この結果は、*mtrR* 遺伝子の変異による耐性メカニズム以外に転写活性化因子である *mtrA* によって *mtrR* の能力を低下させ過剰発現を引き起こし耐性獲得している可能性が示唆される¹⁰⁾。本研究では変異による耐性機序の解析を行ったことから、過剰発現を定量測定することを目的

に *mtrCDE* ファミリーの発現量についてリアルタイム PCR を用いて測定する必要があると考える。また、*mtrR* 以外の *penA*, *penB* といった耐性機構の存在²⁾ によって耐性化した可能性も示唆されることからほかの耐性遺伝子についても解析する必要があると考えた。

V. 結語

本研究より、日本国内の分離株において *mtrR* における変異が確認された。今後、変異を有した耐性株の蔓延が懸念されるため、継続的なサーベイランスが必要である。

文献

- 1) 感染症情報, 性感染症報告数, 厚生労働省ホームページ URL: <https://www.mhlw.go.jp/topics/2005/04/tp0411-1.html> (最終閲覧日 2021年11月2日)
- 2) Unemo M, William M. et al : Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: past, evolution, and future. Clin. Microbiol. Rev, 2014, 27 (3) : 587. DOI: 10.1128/CMR.00010-14.
- 3) Grace A. Beggs, Yaramah M. Zalucki, Nicholas Gene Brown et al. Structural, Biochemical, and In Vivo Characterization of *MtrR*-Mediated Resistance to Innate Antimicrobials by the Human Pathogen *Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol. 2019 Oct 15; 201(20): e00401-19. DOI: 10.1128/JB.00401-19
- 4) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. M100-S25, Wayne, PA, 2015
- 5) 濱砂良一, 安田満, 高橋聡・他. 感染症治療ガイドライン2018. 日本化学療法学会雑誌 Vol.66 No.3 JAID/JSC
- 6) 大西真, 渡辺祐子. 淋菌感染症に関する最新情報. 抗菌薬耐性. IASR Vol. 29 p. 247-248: 2008年9月号
- 7) 安田満. セファロスポリン耐性淋菌の現状と問題点. 感染症 TODAY. 2017年2月8日.
- 8) 清田浩, 石地尚興, 岸本寿男・他. 性感染症診断・治療ガイドライン2016: 日本性感染症学会誌. Vol.27, No.1 Supplement
- 9) Douglas M. Warner, William M. Shafer and Ann E. Jerse. Clinically Relevant Mutations that Cause Derepression of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrC-MtrD-MtrE Efflux Pump System Confer Different Levels of Antimicrobial Resis-

tance and In Vivo Fitness. *Mol Microbiol.* Author manuscript; available in PMC 2009 Oct 1. DOI: 10. 1111/j. 1365-2958. 2008. 06424. x

- 10) Yaramah M. Zalucki, Vijaya Dhulipala and William M. Shafera. Dueling Regulatory Properties of a Transcriptional Activator (*MtrA*) and Repressor (*MtrR*) That Control Efflux Pump Gene Expression in *Neisseria gonorrhoeae*. *mBio.* 2012 Nov-Dec 3(6): e00446-12. DOI: 10. 1128/mBio. 00446-12

Analyses of Drug Efflux Genes in *Neisseria gonorrhoeae*

Yuta Endo, Hiroki Kondo, Genki Maruyama, Yoko Mano, Nobuhiko Furuya

Graduate School of Health Care Science, Bunkyo Gakuin University

Abstract

In recent years, decreases in susceptibility to ceftriaxone (CTR_X) with corresponding increases in resistant strains have increasingly challenged clinical practice, drawing scientific attention to these trends. To date, few studies in Japan have examined the drug excretion mechanism of *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*). In this study, penicillin G (PCG), cefixime (CFIX), CTR_X, spectinomycin (SPCM), tetracycline (TC), and Ciprofloxacin (CPFX) were used to study 91 strains of *N. gonorrhoeae* isolated from 2005 to 2010 at the Kanto branch of the inspection contract center. Each strain was tested for susceptibility, and *mtrR* was sequence-analyzed. When MIC₅₀ values were grouped according to presence or absence of mutation, the cephalosporin (CFIX) MIC₅₀ increased from 0.06 µg/mL (no mutation) to 0.25 µg/mL (with mutation). When the mutation group was subdivided by mutation, the largest subgroup (23 strains) carried dual mutations (Gly-45-Asp and Thr-105-His). Nineteen of these strains were found to show low sensitivity or resistance to CFIX. Since CFIX is an oral drug and is easier to prescribe than an intravenous drug, it is thought that as the frequency of use increased, the number of insensitive strains increased. This study suggests that treatment with CFIX will become increasingly ineffective in the future.

Key words ——— *Neisseria gonorrhoeae*, *mtrR*, Cefixime

Bunkyo Journal of Health Science Technology vol.14: 1-5