

## 平成28年度医療研究開発推進事業費補助金 (新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業) 成果報告書

### I. 基本情報

事業名 : (日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業  
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名 : (日本語) 薬剤耐性感染症の分子疫学解析手法の確立と薬剤耐性化機構に関する研究  
(英語) Study on antimicrobial resistant STI pathogens

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所 細菌第一部 部長 大西 真  
所属 役職 氏名 : (英語) National Institute of Infectious Diseases  
Department of Bacteriology I, Director Makoto Ohnishi

実施期間 : 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名 : (日本語) 中部／東北／北海道／関東地域で分離される淋菌の薬剤感受性の地域間比較  
(英語) Comparison of Antimicrobial susceptibility of *N. gonorrhoeae* isolated from multi-area in Japan.

補助事業分担者 (日本語) 国立大学法人岐阜大学医学部附属病院泌尿器科 講師 安田 満  
所属 役職 氏名 : (英語) Gifu University Hospital, Department of Urology, Lecturer Mitsuru Yasuda

分担研究課題名 : (日本語) 九州地域分離淋菌の薬剤感受性プロファイルの特性  
(英語) Antimicrobial susceptibility profile of *N. gonorrhoeae* isolated in Kyushu

補助事業分担者 (日本語) 産業医科大学 医学部 泌尿器科 講師 濱砂良一  
所属 役職 氏名 : (英語) University of Occupational and Environmental Health, Department of Urology, Lecturer Ryo-ichi Hamasuna

分担研究課題名 : (日本語) 九州／関東地域分離淋菌の薬剤感受性の地域間比較  
(英語) Antimicrobial susceptibility comparison between Kyushu and Kanto gonococcus isolates.

補助事業分担者 (日本語) 東邦大学看護学部・感染制御学 教授 小林寅祐  
所属 役職 氏名 : (英語) Toho University, Dept. of Infection Control and Prevention, Faculty

of Nursing, Professor Intetsu Kobayashi.

分担研究課題名：（日本語）国内分離淋菌のゲノム解析

（英 語）Genomic analysis of *N. gonorrhoeae*

補助事業分担者（日本語）東邦大学医学部・臨床微生物学 教授 石井良和

所属 役職 氏名：（英 語）Toho University, Dept. Microbiology and Infectious Diseases,  
Professor Yoshikazu Ishii.

分担研究課題名：（日本語）兵庫県で分離される淋菌の薬剤感受性測定および遺伝子学的検討

（英 語）A Genetic analysis of *N. gonorrhoeae* isolated in Hyogo

補助事業分担者（日本語）国立大学法人神戸大学大学院保健学研究科 准教授 大澤佳代

所属 役職 氏名：（英 語）Kobe University Graduate School of Health Sciences, Department of  
Biophysics, Associate professor, Kayo Osawa

分担研究課題名：（日本語）地方自治体における淋菌株収集システムの構築と菌株解析

（英 語）*N. gonorrhoeae* isolates collection system in local public health  
institutes

補助事業分担者（日本語）東京都健康安全研究センター・微生物部主任研究員 三宅啓文

所属 役職 氏名：（英 語）Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Department of  
Microbiology, Senior Researcher Hirofumi Miyake

分担研究課題名：（日本語）淋菌の分子型別法の確立と国内分離株の比較解析

（英 語）Development of a novel molecular typing method

補助事業分担者（日本語）神戸市環境保健研究所・感染症部研究員 中西典子

所属 役職 氏名：（英 語）Kobe Institute of Health , Department of Infectious Diseases,  
Research fellow Noriko Nakanishi

## II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究において、2016年に分離された淋菌796株が感染研（大西）、岐阜大（安田）、東邦大（小林）、神戸大（大澤）、東京都（三宅）が収集された。薬剤感受性試験の結果、治療が期待されない

（Intermediate および Resistant）の菌株の分離割合(EUCAST クライテリア使用)は、PCG では 97%, CFM では 43%, CRO では 4%, フルオロキノロンでは 78%, AZM では 33%であった。スペクチノマイシンに対しては全て感受性であった。感受性試験結果は WHO に報告することで準備が進められている。また、検査会社で得られている感受性試験結果の集計プログラムが完成した。

岐阜大安田によって、AZM の臨床効果が評価され 20%は除菌不能例であった。また MLST 解析により AZM 耐性を示す MLST1579 に属する株の増加が認められた。国内での AZM 使用は推奨できないことが示された。新規フルオロキノロンの淋菌に対する *in vitro* の評価が産業医大濱砂によってなされた。

感染研大西らによって、セフトリアキソン耐性株の耐性遺伝子の比較解析を実施し、配列情報に基づいた耐性株検出用の核酸検査法を開発した。また、セフトリアキソン耐性株の小規模な拡散が認められた。また、東邦大小林らによって、口腔常在ナイセリア属菌のセフトリアキソン耐性が認められることが明らかになり、これらが淋菌の耐性遺伝子のソースとなっていることが示唆された。感受性試験結果の施設間評価に使用できる8株を評価し、広く提供可能な状態とした。ディスク法と微量液体希釈法について評価を行った（神戸大大澤ら）。特にセフトリアキソン耐性株のスクリーニング法を提案することが可能となった。

神戸市中西らによって、新規の分子タイピング法の開発と評価が実施された。2015年分離206株のゲノム情報を取得し、比較解析を進めた。また、完全長ゲノム配列の決定が進められた。

In 2016, 796 *Neisseria gonorrhoeae* isolates were collected nationwide by NIID (Dr. Ohnishi), Gifu Univ. (Dr. Yasuda), Toho Univ. (Prof. Kobayashi), Kobe Univ. (Dr. Osawa) and Tokyo Metropolitan Institute of Public Health (Dr. Miyake). Antimicrobial susceptibility testing showed that resistance rate (resistance and intermediate) for penicillin G (PEN), cefixime (CFM), ceftriaxone (CRO), ciprofloxacin (CIP) and azithromycin (AZM) were 97%, 43%, 4%, 78% and 33%, respectively, according to EUCAST criteria. All were susceptible to spectinomycin. The data will be reported to Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS). In addition to our isolate based surveillance, the project developed the platform for data collecting system from commercial laboratories.

Efficacy of AZM treatment (2 g) was evaluated in a clinical setting. The data clearly showed that the regime was not recommended as an empirical therapy for gonorrhea in Japan, because in 20% of cases *N. gonorrhoeae* was not eradicated. In the investigation, AZM resistant *N. gonorrhoeae* belonged to MLST 1579 increased. *In vitro* activity of a novel fluoroquinolone, which has not been applicable for gonorrhea yet, was tested by Dr. Hamasuna. Data showed the antimicrobial has potency against *N. gonorrhoeae*, suggesting a new option for the therapy, single or combination with other drugs.

Resistant mechanism of CRO resistant *N. gonorrhoeae* isolated in 2015 in Osaka was investigated. The strain got a resistant determinant from commensal *Neisseria* species, resulting in constructing chimeric structure of PBP 2 gene, which is the main determinant for CRO resistance. The small outbreak of the CRO resistant *N. gonorrhoeae* was detected in Kansai area. Based on the chimeric structure, a new detecting tool for the resistant allele was developed by NIID, and evaluation of the tool, specificity and sensitivity, is in progress. Also our

project tried to find out CRO resistant determinant in commensal *Neisseria* spp., which are speculated as a donor of CRO resistance based on the comparison with *penA* gene of CRO resistant *N. gonorrhoeae*.

Strain panel for evaluation of antimicrobial susceptibility testing was constructed, and the susceptibility was measured by 5 laboratories (NIID, Gifu university, Toho university, Kobe University and Tokyo Metropolitan PHI). The panel is now ready for distribution. Disk diffusion testing and a new liquid dilution testing was evaluated, using the panel and clinical isolates collected in this project.

Multilocus variable-number tandem repeat analysis for *N. gonorrhoeae* was evaluated using more than 700 strains isolated in Japan. Also 206 clinical isolates collected in 2015 was sequenced by Illumina MiSeq, comparative genome analysis is in progress. Among them 24 genomes were completed using Pac Bio sequencer.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 5 件）

1. Seike K, Yasuda M, Hatazaki K, Mizutani K, Yuhara K, Ito Y, Fujimoto Y, Ito S, Tsuchiya T, Yokoi S, Nakano M, Deguchi T. Novel *penA* mutations identified in *Neisseria gonorrhoeae* with decreased susceptibility to ceftriaxone isolated between 2000 and 2014 in Japan. J Antimicrob Chemother. 2016, 71, 2466-70.
2. Ito S, Yasuda M, Hatazaki K, Mizutani K, Tsuchiya T, Yokoi S, Nakano M, Deguchi T. Microbiological efficacy and tolerability of a single-dose regimen of ceftriaxone 1 g in men with gonococcal urethritis. J Antimicrob Chemother. 2016, 71, 2559-62.
3. Yasuda M, Ito S, Hatazaki K, Deguchi T. Remarkable increase of *Neisseria gonorrhoeae* with decreased susceptibility of azithromycin and increase in the failure of azithromycin therapy in male gonococcal urethritis in Sendai in 2015. J Infect Chemother. 2016, 22, 841-3
4. Yasuda M, Hatazaki K, Ito S, Kitanohara M, Yoh M, Kijima M, Narita H, Kido A, Miyata K, Deguchi T. Antimicrobial Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Japan from 2000 to 2015. Sex Transm Dis. 2017, 44, 149-53.
5. Nakayama SI, Shimuta K, Furubayashi KI, Kawahata T, Unemo M, Ohnishi M. New ceftriaxone- and multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strain with a novel mosaic *penA* gene isolated in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2016, 60, 4339-41.

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 性感染症ガイドライン, 口頭, 安田 満, 第 104 回日本泌尿器科学会総会, 2016/4/23, 国内
2. Clinical trials for Gonococcal Urethritis by Azithromycin 2g Single Dose, 口頭, Yasuda M, 19<sup>th</sup> IUSTI ASIA-PACIFIC CONFERENCE, 2016/12/1, 国外
3. 尿道炎原因菌に対する抗菌活性; 淋菌に対する抗菌活性, 口頭, 安田 満, 日本性感染症学会第 29 回学術大会, 2016/12/4, 国内
4. 口腔内常在菌の penicillin に対する感受性に関する検討、ポスター発表、金坂伊須萌, 金山明子, 鈴木夏枝, 松崎薫, 松本哲, 金子明寛, 小林寅苗、第 90 回日本感染症学会・学術講演会 2016.4.16, 国内
5. 関東関東地方より分離された *Neisseria gonorrhoeae* の各種抗菌薬感受性について、口頭、金

- 坂伊須萌, 勝瀬(金山)明子, 伊與田貴子, 天野綾子, 松崎薫, 松本哲, 小林寅喆, 日本性感染症学会 第7回関東甲信越支部総会 2016.10.29, 国内
6. 口腔由来 *Neisseria* sp.に対する各種抗菌薬感受性に関する検討, 口頭, 金坂伊須萌, 勝瀬(金山)明子, 小林寅喆, 山根夏枝, 金子明寛, 松崎薫, 松本哲, 古屋隆三郎, 田中正利, 日本性感染症学会 第29回学術大会 2016.12.4, 国内
  7. 関東地方において分離された *Neisseria gonorrhoeae* の抗菌薬感受性に関する検討, 口頭, 金坂伊須萌, 倉地里枝, 勝瀬(金山)明子, 小林寅喆, 伊與田貴子, 天野綾子, 松崎薫, 松本哲, 日本性感染症学会 第29回学術大会 2016.12.4, 国内学会
  8. Mechanism and molecular epidemiological typing of *Neisseria gonorrhoeae* with decreased susceptibility to cephalosporin. ポスター, Osawa K, Shigemura K, Nukata Y, Nakanishi N, Yoshida H, Arakawa S, Shirakawa T, Fujisawa M, 19th IUSTI Asia-Pacific Conference, 2016/12/1-3, 国外.
  9. 本邦で分離されたセフトリアキソン低感受性淋菌の *penA* アリルおよび遺伝的背景に関する検討, 口頭, 青木弘太郎, 石井良和, 舘田一博, 日本性感染症学会 第7回 関東甲信越支部総会・学術講演会, 2016/10/29, 国内
  10. *Neisseria gonorrhoeae penA* (PBP2) アリル分類とセフトリアキソン感受性との関連性に関する検討, 口頭, 青木弘太郎, 花尾麻美, 石井良和, 舘田一博, 第28回 日本臨床微生物学会総会・学術集会, 2017/1/21, 国内
  11. 本邦における薬剤耐性淋菌の遺伝的背景と薬剤感受性との関連性に関する検討, 口頭, 花尾麻美, 青木弘太郎, 石井良和, 舘田一博, 第28回 日本臨床微生物学会総会・学術集会, 2017/1/21, 国内
  12. モザイク PBP2 保有淋菌におけるセフトリアキソン耐性補助因子の探索, ポスター, 青木弘太郎, 志牟田健, 大西真, 石井良和, 舘田一博, 第90回日本細菌学会総会, 2017/3/19, 20, 国内
  13. セフェム系抗菌薬低感受性淋菌の遺伝学的解析, 口頭, 額田雪絵, 大澤 佳代, 重村克巳, 吉田弘之, 藤澤正人, 荒川創一, (第64回日本化学療法学会総会, 2016/6/9-6/11, 国内.
  14. Are antibiotic-resistant *Neisseria gonorrhoeae* still increasing in Japan? ポスター, Kayo Osawa, Katsumi Shigemura, Hiroyuki Yoshida, Toshiro Shirakawa, Soichi Arakawa, Masato Fujisawa. 19th IUSTI Asia-Pacific Conference, 2016/12/1-12/3, 国外.
  15. 大学病院における尿中淋菌・クラミジア同時 PCR 検査についての後ろ向き検討. 口頭, 重村克巳, 中野 雄造, 大澤 佳代, 直本 拓己, 時松 一成, 荒川 創一, 藤澤 正人, 第29回日本性感染症学会学術大会, 2016/12/3-12/4, 国内.
  16. 淋菌の薬剤感受性試験法の比較検討. 口頭, 大澤 佳代, 重村 克巳, 吉田 弘之, 藤澤 正人, 荒川 創一, 第22回兵庫県性感染症 (STI) 研究会総会・第6回日本性感染症学会関西支部総会, 2017/3/18, 国内.
  17. 薬剤耐性淋菌の耐性獲得・伝播の分子機構, 口頭, 大西 真, 第104回日本泌尿器科学会総会, 2016/4/23, 国内

(3)「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

特記なし

(4) 特許出願

該当なし