

主 論 文

Antimicrobial susceptibilities of *Chlamydia trachomatis* isolated from the urethra and pharynx of Japanese males

(日本人男性の尿道および咽頭から分離された *Chlamydia trachomatis* の抗菌薬感受性)

【緒言】

Chlamydia trachomatis (*C. trachomatis*) による性感染症、特に男性尿道炎と子宮頸管炎の蔓延は、世界的な懸念事項である。その中で、国外からではあるが薬剤に耐性を示す *C. trachomatis* 株による治療失敗例が報告されている。また、*C. trachomatis* による男性尿道炎と子宮頸管炎は、オーラルセックスにより咽頭からも感染するが、咽頭感染においては男性尿道炎と子宮頸管炎に比べて治療に抵抗性を示すという報告もある。2016年に、日本における男性尿道から分離された *C. trachomatis* 株の高い薬剤感受性が報告されているが、咽頭から分離された株の薬剤感受性は報告されていない。本研究の目的は、日本人男性の尿道と咽頭から分離される *C. trachomatis* の抗菌薬感受性を調査することであり、日本化学療法学会標準法を用いて、ガイドライン治療に推奨されている levofloxacin (LVFX) と azithromycin (AZM) の Minimum Inhibitory Concentration (MIC) を測定した。

【対象と方法】

対象

対象は 2013 年～2014 年に岡山大学病院泌尿器科、あらかき腎・泌尿器科クリニック、平島クリニックを受診した成人男性尿道炎患者である。尿道のみ、もしくは尿道と咽頭両方から *C. trachomatis* が分離された患者について、年齢、尿道炎による症状の有無、尿検体の核酸増幅検査の結果を患者カルテから抽出した。

C. trachomatis 分離のための臨床検査検体とクラミジア培養

スワブ法により咽頭ぬぐい液、および尿道分泌物を採取した。採取したスワブ検体は sucrose を含む HEPES buffer 中で保管し、速やかに -70°C で凍結保存した。

我々が 2009 年に報告した方法を用いてクラミジアの分離培養を行った。すなわち、スワブの入った凍結チューブを 37 度のプール内で急速に解凍、ボルテックスミキサーでスワブから上皮細胞およびクラミジアを分離した。上皮細胞を超音波破碎装置で破壊し、室温で 3 分間の 300×G の遠心分離し、菌液として準備した。24 穴の細胞培養プレート内で単層に培養した McCoy 細胞を宿主細胞として、0.25ml の菌液を静かに注入し、クラミジア

を上皮細胞に付着させるためにプレートを遠心吸着した。その後、cycloheximide、kanamycin、vancomycin、amphotericin Bを含むEagle培地(DMEM)をそれぞれ1mlずつに入れ、細胞を37度、5% CO₂下で培養した。培養の成熟度、すなわち宿主細胞の変性は位相差顕微鏡を用いて適宜観察した。宿主細胞の崩壊が見られたら、速やかに滅菌ゴム片でプレートから剥ぎ取り、宿主細胞ごとSPG buffer中で-70度に保温した。

蛍光染色

クラミジアの存在を確かめるため、封入体の観察は蛍光抗体による染色を行った。直径14mmカバーガラス上のMcCoy細胞接合分子層に感染後、48 - 50時間培養した後、99.5%エタノールで固定し、クラミジア科特異的モノクローナル抗体で染色して蛍光顕微鏡で観察した。

薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は1991年に出版された日本化学療法学会標準法で測定した。日本における治療ガイドライン、「性感染症 診断・治療ガイドライン 2011 (日本性感染症学会)、JAID/JSC 感染症治療ガイド (日本感染症学会/日本化学療法学会) で推奨されている抗菌薬であるLVFXとAZMに対する薬剤感受性を測定した。

予備実験

HeLa229細胞のコンディションおよび薬剤感受性測定方法に問題がないか調べるため、*C. trachomatis*のreference strainを用いて予備実験を行った。国立感染症研究所から購入したHeLa229細胞を、10%の熱不活性化させたウシ胎児血清を含むDMEMで、先述のように培養した。位相差顕微鏡を用いて適宜、細胞のコンディションを観察した。serovar A、C、D (UW-3/Cx) (reference strain)、F、G、Hに対するLVFX MICおよびAZM MICを臨床分離株を試験する前に測定した。

【結果】

患者背景

*C. trachomatis*による尿道炎と診断された患者18例を対象とした。そのうち7例は咽頭からも*C. trachomatis*が分離されており、尿道由来18株、咽頭由来7株の*C. trachomatis*について、薬剤感受性を測定した。患者背景については、患者の平均年齢は25.7±7.8歳であった。臨床症状は8例に排尿痛、4例に排膿、4例に両方の臨床症状を認め、1例は無症状であった。咽頭の症状を訴える症例は認めなかった。患者はすべて拡散増幅検査 (polymerase chain reaction: PCR法もしくはStandard displacement amplification: SDA法) によってクラミジア性尿道炎と診断された。

予備実験結果

単層培養された HeLa229 細胞に Serovar A、C、D/UW-3/Cx (reference strain)、F、G、H を感染させて測定した LVFX MIC は、それぞれ 0.25、0.25、0.125、0.25、0.25 および 0.125 mg/mL であった。AMZ MIC は、すべて 0.25mg/mL であった。HeLa229 細胞の増殖や感染性、*C. trachomatis* の reference strain、測定手技すべてにおいて、薬剤感受性の測定が適切に行われたことが示された。

薬剤感受性

前述した 18 例の男性尿道炎患者から得られた *C. trachomatis* 株、すなわち、尿道から分離された 18 株と咽頭から検出された 7 株の薬剤感受性を測定した。尿道分離株に対する LVFX MIC と AZM MIC はともに 0.125 µg/mL-0.5 µg/mL であった。LVFX と AZM の MIC₅₀/MIC₉₀ は、それぞれ 0.25/0.5 µg/mL と 0.25/0.25 µg/mL であった。一方、咽頭から分離された *C. trachomatis* に対する LVFX MIC は 0.125 µg/mL-0.5 µg/mL、AZM MIC は 0.125 µg/mL-0.25 µg/mL であった。LVFX と AZM の MIC₅₀/MIC₉₀ 値は、それぞれ 0.5/0.5 µg/mL と 0.25/0.25 µg/mL であった。尿道、咽頭ともに *C. trachomatis* が分離された 7 例のうち、咽頭分離株の AZM MIC が測定できなかった 1 例を除く 6 例において、尿道分離株と咽頭分離株の MIC は一致していた。

【考察】

尿道から分離された *C. trachomatis* 18 株と咽頭から分離された 7 株に対する LVFX MIC と AZM MIC を日本化学療法学会標準法で測定した。*C. trachomatis* の薬剤感受性については、日本を含む多くの国からも報告がある。海外からは治療抵抗性の性感染症患者から分離された *C. trachomatis* に薬剤耐性が認められたと報告されているが、日本から同様の報告はなく、2016 年には日本人男性の尿道から分離した *C. trachomatis* に薬剤耐性はみられなかったと報告された。本研究では、尿道から分離された *C. trachomatis* に対する LVFX MIC と AZM MIC はそれぞれ 0.125-0.5 µg/mL と 0.125-0.25 µg/mL であり、LVFX と AZM の MIC₅₀/MIC₉₀ 値はそれぞれ 0.25/0.5 µg/mL と 0.25/0.25 µg/mL であった。この結果は、日本人男性の尿道から分離された *C. trachomatis* に薬剤耐性株はみられないという報告を裏づけるものであると考えられる。

C. trachomatis の咽頭感染は、比較的近年になってから焦点とされている。*C. trachomatis* の咽頭感染は男性尿道炎や子宮頸管炎と比べ、治療に抵抗性を示すと報告されている。にも関わらず、咽頭から分離された *C. trachomatis* の薬剤感受性に関する研究論文はこれまでに報告されていない。それは、咽頭標本からのクラミジア培養は、洗口液中のクラミジア量が少ないこと、スワブ法が侵襲的技法であること、口腔内は他の微生物が混入するといった理由からであると考えられる。本研究は、咽頭から分離した *C. trachomatis* 株の薬剤感受性を最初に報告したものである。咽頭から分離された *C.*

trachomatis 株に薬剤耐性は認めなかったが、今回の結果は臨床医にとって有意義なものになることが予想される。臨床医は最新の調査結果に基づいたガイドラインで推薦される治療法でクラミジア感染に対して抗菌薬治療をしなければならないが、日本でも近い将来、薬剤耐性 *C. trachomatis* や治療抵抗性の性感染症が出現するかもしれない。臨床医が治療に抵抗性を示す症例に直面した際、薬剤耐性 *C. trachomatis* の存在や抗菌薬の組織移行性、またその他の原因を考慮しなければならない。そのためにも、非常に複雑かつ煩雑ではあるが、*C. trachomatis* の薬剤感受性調査が必要であると考えられる。

本研究はいくつか **Limitation** がある。第一に、本研究は、限られた地域から集められた少数の患者群であること、第二に、標本を MIC 測定前にクローニングせずに培養していること、第三に、同一患者から分離された尿道と咽頭からのクラミジア株を *ompA* シークエンス、または多座位配列タイピングを用いて同一かどうか示してはいないこと、である。しかし、これらを考慮しても *C. trachomatis* の薬剤感受性調査は必要であり、さらに大規模かつ長期の調査が求められる。

結論として、我々のデータは、LVFX と AZM が日本の *C. trachomatis* による性感染症治療に有効な抗菌薬であることを示唆するものであった。尿道と子宮頸部から分離された株だけでなく、咽頭分離株についても調査することが必要である。

【結論】

尿道、咽頭から分離された *C. trachomatis* に対する LVFX および AZM の良好な薬剤感受性が確認された。