

## 【原著・基礎】

臨床材料からのニューキノロン薬耐性 *Neisseria gonorrhoeae* の  
直接検出法の検討金山 明子<sup>1)</sup>・島津 光伸<sup>2)</sup>・長谷川美幸<sup>1)</sup>・雑賀 威<sup>1)</sup>・小林 寅詰<sup>1)</sup><sup>1)</sup>三菱化学ビーシーエル・化学療法研究室\*<sup>2)</sup>同 細胞遺伝解析部

(平成 11 年 1 月 14 日受付・平成 11 年 4 月 5 日受理)

*Neisseria gonorrhoeae* のニューキノロン薬耐性機構は主に *gyrA* および *parC* の変異で、本菌感染症において *gyrA* の変異はキノロン系抗菌薬の治療に大きく影響する。今回われわれは患者試料から直接 *N. gonorrhoeae* およびその *gyrA* 変異を検出することを目的として基礎的および臨床的検討を行った。試験菌として、*N. gonorrhoeae* は *gyrA* 変異を認めない wild 株 1 株および codon 91 のアミノ酸が serine (TCC) から phenylalanine (TTC) に変異が認められている臨床分離 5 株を用い  $\alpha$ -hemolytic *Streptococcus*, Coagulase (-) *Staphylococcus* および *Escherichia coli* との混合菌液中の *N. gonorrhoeae gyrA* codon 91 の直接検出を行った。この検出には PCR 法および酵素抗体法を用いた Pin-Point Sequence (PPS) 法により行った。その結果、各試験菌液 (単独, 混合液) から *N. gonorrhoeae* の wild 株および変異株の *gyrA* codon 91 の分離検出が可能であった。さらに臨床材料における検討では、*N. gonorrhoeae* 感染症が疑われた患者より採取した 56 検体において、*N. gonorrhoeae* の陽性例は培養法で 36 検体に対し PPS 法は 38 検体となった。培養法で *N. gonorrhoeae* を検出した例は PPS 法ですべて陽性となった。PPS 法陽性 38 例中 *gyrA* codon 91 のアミノ酸が変異していた例は 20 例で、1 例を除き培養法で得られた分離株でのアミノ酸変異の結果とすべて一致した。またその変異と norfloxacin (NFLX) の MIC とは相関していた。以上の結果から PPS 法は *N. gonorrhoeae* 感染症患者にキノロン系抗菌薬の治療を行う場合、その有効性を予測する上できわめて有用な方法であることが示唆された。

**Key words:** *Neisseria gonorrhoeae*, fluoroquinolone-resistance, direct detection, *gyrA* mutation

1957 年の売春防止法の施行によりわが国における性行為感染症は減少傾向<sup>1)</sup>にあったが近年では性への多様化や若年化によってその傾向も下げ止まりで逆に増加傾向にもあると言われている<sup>2,3)</sup>。それらの感染様式も多様化し生殖器周辺の感染に定まらず咽頭などその他の部位にも拡大している<sup>4)</sup>。これらの感染症の中でも特徴的なのは *Neisseria gonorrhoeae* 感染症で、最近では明らかな増加傾向を示し、分離菌の薬剤感受性にも変化を認めている。かつて多く分離され問題となった Penicillinase Producing *N. gonorrhoeae* (PPNG) は近年では著しい減少傾向<sup>5)</sup>を示し、反面ニューキノロン薬耐性株が急増している<sup>5,6)</sup>。これらニューキノロン薬耐性株の増加は本菌感染症に多く用いられているニューキノロン薬による治療には深刻な問題である。*N. gonorrhoeae* におけるニューキノロン薬耐性機構については種々の報告があるがその主たる機構は *gyrA* の変異であることが知られている<sup>7)</sup>。

今回われわれは患者検体より本菌における *gyrA* codon 91 の変異を PCR 法および酵素抗体法を用いて直接検出する Pin-Point Sequence (PPS) 法を開発し有用な成績を得たので報告する。

## I. 材料と方法

## 1. 使用菌株と薬剤

1998 年 4 月に当研究室において全国の医療機関より集められた臨床材料より分離された  $\alpha$ -hemolytic *Streptococcus*, Coagulase (-) *Staphylococcus*, *Escherichia coli* および *N. gonorrhoeae* 各 5 株を使用した。

また使用薬剤として norfloxacin (NFLX; Sigma) を用いた。

2. PCR 法による *N. gonorrhoeae gyrA* の増幅および Pin-Point Sequence (PPS) 法による *gyrA* codon 91 の検出 (Fig. 1)

1) PCR 法による *gyrA* の増幅

Primer は, forward: 5'-CGCGATGCACGAGCTGAA AAA-3' (nucleotide positions 174-194) および reverse: 5'-ATTTCGGTATAGCGCATGGCTG-3' (nucleotide positions 377-398)<sup>7)</sup> を用い、1.0  $\mu$ l Template, 1.0  $\mu$ l 10 mM deoxynucleotides (dATP, dCTP, dGTP および dTTP, 以下 dNTPs), 5.0  $\mu$ l 10  $\times$  *Taq* polymerase buffer (100 mM Tris HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% gelatin), 0.5  $\mu$ l 各 primer (25 pmol/ $\mu$ l),

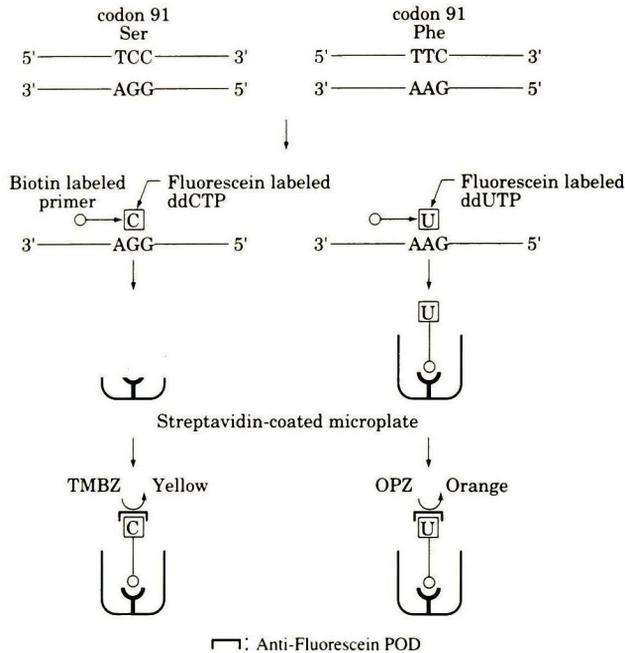


Fig. 1. Scheme for detection of *Neisseria gonorrhoeae* in *gyrA* at codon 91 by PPS.

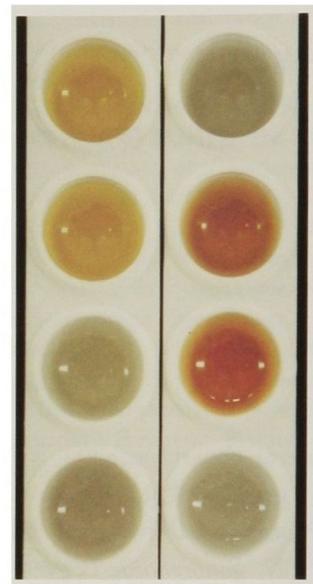


Fig. 2. Representative color appearance of amino acid mutation in *gyrA* at codon 91 of *Neisseria gonorrhoeae* by PPS in reaction wells.

A: Wild type strain *gyrA* codon 91: TCC (Ser), B: Wild type strain/Mutant, C: Mutant *gyrA* codon 91: TTC (Phe), D: No *N. gonorrhoeae*

5.0  $\mu$ l 0.2% Triton X-100, 0.25  $\mu$ l *Taq* DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l) を含む反応液組成で 93°C 0.5 min, 52°C 1 min, 72°C 1 min のサイクルを 30 回行いキノロン耐性決定領域を含む DNA を増幅した。

## 2) 残存 dNTPs の除去

1) で作製した PCR 産物 20  $\mu$ l に Phosphatase alkaline, Shrimp (ロシユダイアグノスティックス) 2 単位, 0.5  $\mu$ l 10 $\times$ *Taq* polymerase buffer および 3.5  $\mu$ l の滅菌精製水を加え, 37°C にて 90 min さらに 80°C にて 15 min 反応させた。

## 3) 標識物の取り込み反応

以下に示すように *N. gonorrhoeae gyrA* codon 91 の第二塩基にフルオレセインを標識した dideoxyCTP または dideoxy UTP を取り込ませた。野生型 (TCC, serine) の検出には 0.1  $\mu$ l フルオレセイン標識 dideoxy CTP (10 nM), 変異型 (TTC, phenylalanine) の検出には同 dideoxy UTP に 2  $\mu$ l deoxy NTP 除去済 PCR 反応産物, 0.125  $\mu$ l Biotin 標識プライマー (25 pmol/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l 10 $\times$ *Taq* polymerase buffer, 0.06  $\mu$ l *Taq* DNA polymerase を含む反応液組成で 94°C 0.5 min, 60°C 0.5 min, 72°C 0.5 min (25 cycles) の条件で反応させた。

## 4) 標識物の検出

1 サンプルにつき White Combiplate 8 Streptavidin Coated (Labsystems) の 2 ウェルを使用した。各ウェルに 300  $\mu$ l の Binding buffer (1 $\times$ PBS, 0.1% Bovine serum albumin) と 3) の反応産物 10  $\mu$ l を加え, 37°C

にて 30 分静置した。その後これらを取り除き wash buffer (10 mM Tris HCl pH 9.5, 300 mM NaCl) 300  $\mu$ l で 3 回洗浄した。次に 50 mM NaOH 溶液 300  $\mu$ l を入れ 5 分間静置後取り除き, さらに wash buffer で 2 回洗浄した。ウェル中の水分を十分に取り除いたのち, 1,000 倍希釈ペルオキシダーゼ標識フルオレセイン抗体 Anti-Fluorescein-POD (Boehringer Mannheim) 100  $\mu$ l を加え, 37°C にて 30 分反応させた。その後再び wash buffer にて 2 回洗浄を行った。2 ウェルのうち 1 ウェルをペルオキシダーゼ用発色キット T (スミロン), 残りの 1 ウェルを同キット O を用い発色させ, 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100  $\mu$ l で停止させた。

本系では dideoxy CTP を取り込んだ場合黄色, dideoxy UTP の場合は橙色に発色させ肉眼で判定した。前者の場合 codon 91 の第二塩基が C のためコードするアミノ酸は serine, 後者は T であるため phenylalanine となる (Fig. 2)。

## 3. 混合菌液からの *N. gonorrhoeae gyrA* codon 91 検出

各使用菌株を滅菌精製水に約 10<sup>4</sup> CFU/ml となるように懸濁させ *N. gonorrhoeae* とその他の菌株の菌液を等量混合した。これを沸騰水浴中で 2 分間煮沸し, 軽く遠心した上清を PCR 法にて *N. gonorrhoeae gyrA* 領域を増幅後 PPS 法に供した。また *N. gonorrhoeae* 単独菌液においても同様に行った。

## 4. 臨床検体からの *N. gonorrhoeae* と, その *gyrA*

## codon 91 検出

1998年1月から4月の間全国の医療機関から集められた男性淋菌性尿道炎患者よりスワブにて採取された尿道分泌物56検体を試験に供した。これらの検体は分離培養を行い、検出菌は常法に従い *N. gonorrhoeae* の同定およびNFLXのMICを測定した。またPCR法にて *gyrA* 領域を増幅後PCR産物を直接Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequence法<sup>8,9)</sup> (以下Cycle Sequence法)によるModel 373 Aオートシークエンサー(ABI社)を用いて塩基配列の決定を行った。さらに培養を行った後の検体を滅菌精製水300  $\mu$ lに入れ激しくミキシングを行い管壁に押し付けスワブを絞りながら取り出し、これを沸騰水浴中で2分間煮沸し、軽く遠心した上清をPCR法にて *gyrA* 領域を増幅後PPS法に用いた。さらに一部の検体はアンプリコア<sup>®</sup> STD-1・ナイセリアゴノレア(ロシュダイアグノスティックス)を用い *N. gonorrhoeae* のDNAの検出を行った。

5. 培養および同定<sup>10)</sup>

培養はセアーマーチン寒天培地(BBL)を用い35 $^{\circ}$ C, 10% CO<sub>2</sub>存在下に於て48~72時間培養を行った。得られたコロニーをゴノチェック-IIキット(コスモ・バイオ株式会社)を用いて *N. gonorrhoeae* の同定を行った。また検出菌のおおよその菌量を10<sup>0</sup>~10<sup>4</sup> CFU/ml: +, 10<sup>5</sup>~10<sup>7</sup> CFU/ml: ++,  $\geq$ 10<sup>8</sup> CFU/ml: +++の3段階で判定した。

## 6. MIC測定法

MIC測定はNCCLS(M100-S8)<sup>11)</sup>に従い、寒天平板希釈法で行った。すなわち、被検菌液を各抗菌薬の2倍希釈系列濃度を含むサプリメント添加GC Agar Base(BBL)にマイクロプランター(佐久間製作所)を用いて10<sup>4</sup> CFU/spotとなるように接種し、35 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>存在下に於て20時間培養した後、菌の発育が認められなかった最小濃度をMICとした。

## II. 結 果

各種試験菌株と混合液からのPPS法による *N. gonorrhoeae* の *gyrA* codon 91の検出結果をTable 1に示した。*a*-hemolytic *Streptococcus*, Coagulase(-) *Staphylococcus*, *Escherichia coli*のいずれを混合した場合においても *gyrA* 変異がないT25株および *gyrA* 変異が認められている5株が検出されT25株の *gyrA* codon 91のアミノ酸はserine(TCC), 残り5株のアミノ酸はすべてphenylalanine(TTC)であった。培養で *N. gonorrhoeae* が検出された36検体におけるPPS法の結果をTable 2に示した。また培養により分離した *N. gonorrhoeae* のCycle Sequence法による *gyrA* codon 91のアミノ酸の結果も表中に示した。PPS法によって36検体すべてserineまたはphenylalanineが検出された。分離菌株のアミノ酸との比較においてGP197の検体からの分離菌はserineに対しPPS法ではphenyla-

lanineと1例のみ不一致となったが、その他35例はすべて一致した。表には示さなかったが培養陰性の20検体に対しPPS法を行ったところ2検体が陽性となりその検出アミノ酸は両者serineであった。またこれら20検体に対しアンプリコアによる確認を行った結果、PPS法で陽性を示した2検体はアンプリコアで陽性でその他18検体はすべて陰性であった。今回試験に供した全56検体に対するPPS法および培養法の成績のまとめをTable 3に示した。培養法で *N. gonorrhoeae* が検出された36検体においてPPS法はすべて陽性を示し、そのうち *gyrA* codon 91のアミノ酸はserineを示したものが16検体、phenylalanineが20検体であった。培養陰性20検体のうちPPS法陰性は18検体、陽性は2検体でこれらのアミノ酸はserineであった。

培養法で分離した *N. gonorrhoeae* 36株に対するNFLXのMICとPPS法で検出した *gyrA* codon 91のアミノ酸との関係をFig. 3に示した。PPS法でserineとなった16検体より分離された株に対するNFLXのMICはすべて0.25  $\mu$ g/ml以下で0.016  $\mu$ g/mlが1株、

Table 1. Detection of *Neisseria gonorrhoeae* and their amino acid of *gyrA* at codon 91 in a mixture of other organisms using Pin-Point Sequencing(PPS)

Organism	<i>N. gonorrhoeae</i>	Nucleotide	Amino acid
<i><math>\alpha</math>-hemolytic Streptococcus</i>			
A(7.2 $\times$ 10 <sup>4</sup> )*	T 25	(2.0 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TCC Ser
A(7.2 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TF 1 A	(2.3 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TTC Phe
B(8.6 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TF 17 A	(4.0 $\times$ 10 <sup>3</sup> )	TTC Phe
C(2.4 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TF 21 A	(2.5 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TTC Phe
D(1.4 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TF 28 A	(1.2 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TTC Phe
E(9.7 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TF 40 A	(2.2 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TTC Phe
Coagulase(-) <i>Staphylococcus</i>			
A(1.6 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	T 25	(2.0 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TCC Ser
A(1.6 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TF 1 A	(2.3 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TTC Phe
B(1.8 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TF 17 A	(4.0 $\times$ 10 <sup>3</sup> )	TTC Phe
C(3.5 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TF 21 A	(2.5 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TTC Phe
D(1.1 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TF 28 A	(1.2 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TTC Phe
E(4.5 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TF 40 A	(2.2 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TTC Phe
<i>Escherichia coli</i>			
A(1.0 $\times$ 10 <sup>5</sup> )	T 25	(2.0 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TCC Ser
A(1.0 $\times$ 10 <sup>5</sup> )	TF 1 A	(2.3 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TTC Phe
B(2.0 $\times$ 10 <sup>5</sup> )	TF 17 A	(4.0 $\times$ 10 <sup>3</sup> )	TTC Phe
C(6.0 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TF 21 A	(2.5 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TTC Phe
D(1.0 $\times$ 10 <sup>5</sup> )	TF 28 A	(1.2 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TTC Phe
E(5.2 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TF 40 A	(2.2 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TTC Phe
none			
	T 25	(2.0 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TCC Ser
	TF 1 A	(2.3 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TTC Phe
	TF 17 A	(4.0 $\times$ 10 <sup>3</sup> )	TTC Phe
	TF 21 A	(2.5 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TTC Phe
	TF 28 A	(1.2 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TTC Phe
	TF 40 A	(2.2 $\times$ 10 <sup>4</sup> )	TTC Phe

(\*)\*: viable cells, CFU/ml

0.03  $\mu\text{g/ml}$  が 7 株, 0.063  $\mu\text{g/ml}$  が 1 株, 0.125  $\mu\text{g/ml}$  が 2 株および 0.25  $\mu\text{g/ml}$  が 5 株であった。一方, PPS 法で phenylalanine となった 20 検体より分離された株に対しては 0.016  $\mu\text{g/ml}$  の 1 株を除きすべて 0.5  $\mu\text{g/ml}$  ~ 32  $\mu\text{g/ml}$  に分布した。このように PPS 法による *gyrA* codon 91 のアミノ酸と NFLX の MIC 値は 1 例を除き相関関係にあることが判明した。

### III. 考 察

わが国における淋菌感染症は 1994~1995 年を境に増加傾向にあるといわれている<sup>2,3)</sup>。その理由として性の多様化や若年層における感染の増加等があげられている。また commercial sex work shop の普及により従来の感染経路と異なった感染様式も 1 つの要因と考えられている<sup>12)</sup>。特にわが国の淋菌はニューキノロン薬耐性株は

経年的に増加傾向にあり田中ら<sup>6)</sup>の報告ではこれらの耐性株は分離株の約 40% を占めていた。ニューキノロン薬耐性淋菌の増加した背景には本菌感染症患者のほとんどは外来治療で患者に対するコンプライアンスから経口抗菌薬が多用されていることがあげられる。なかでもニューキノロン薬が使用されるケースが多く, 患者自身の勝手な服用等による不十分な治療によって起炎菌の耐性化が生じる可能性は否定できない。事実田中らは *in vitro* の検討でニューキノロン薬との接触によって臨床分離 *N. gonorrhoeae* は同系統の薬剤に容易に耐性化することを確認し, 臨床における不適切な治療は生体内で耐性株を誘導する可能性があることを報告した<sup>13)</sup>。これらのニューキノロン薬耐性 *N. gonorrhoeae* に関しては世界中で多くの報告があり主な耐性機構は *gyrA* の変異であると言われている<sup>14,15)</sup>。田中らも *N. gonorrhoeae* のニューキノロン薬耐性は primary に *gyrA* の変異が関与し, それに加え *parC* の変異などの多重変異またニューキノロン薬の取り込み低下によってその耐性度が高くなることを指摘した<sup>13)</sup>。また臨床的な側面からも *gyrA* における codon 91 の serine から phenylalanine の変異はニューキノロン薬の治療に大きく影響をすることを報告した<sup>16)</sup>。われわれが過去に実施した *N. gonorrhoeae*

Table 2. Detection of *gyrA* at codon 91 of *Neisseria gonorrhoeae* in clinical specimens using PPS

No. of Specimen	Culture		PPS
	culture quantification	isolates ( <i>gyrA</i> )	
GP 178	+++	Ser	Ser
GP 179	++	Phe	Phe
GP 180	++	Phe	Phe
GP 181	+++	Phe	Phe
GP 184	+++	Ser	Ser
GP 185	+++	Ser	Ser
GP 187	+++	Ser	Ser
GP 188	++	Ser	Ser
GP 189	+++	Phe	Phe
GP 192	+++	Ser	Ser
GP 193	++	Ser	Ser
GP 196	+++	Phe	Phe
GP 197	+++	Ser	Phe
GP 198	+++	Phe	Phe
GP 199	+	Phe	Phe
GP 201	++	Phe	Phe
GP 203	++	Phe	Phe
GP 204	+++	Ser	Ser
GP 205	++	Phe	Phe
GP 210	++	Phe	Phe
GP 211	++	Phe	Phe
GP 212	+++	Phe	Phe
GP 214	++	Ser	Ser
GP 215	+++	Ser	Ser
GP 216	+++	Ser	Ser
GP 218	++	Ser	Ser
GP 221	++	Phe	Phe
GP 222	+++	Phe	Phe
GP 223	+++	Ser	Ser
GP 227	+++	Ser	Ser
408-4	+	Phe	Phe
408-12	+	Phe	Phe
408-13	++	Phe	Phe
409-2	+	Ser	Ser
413-8	+	Phe	Phe
423-9	+	Ser	Ser

+++ :  $\geq 10^8$  CFU/ml, ++ :  $10^6 \sim 10^7$  CFU/ml, + :  $10^9 \sim 10^4$  CFU/ml

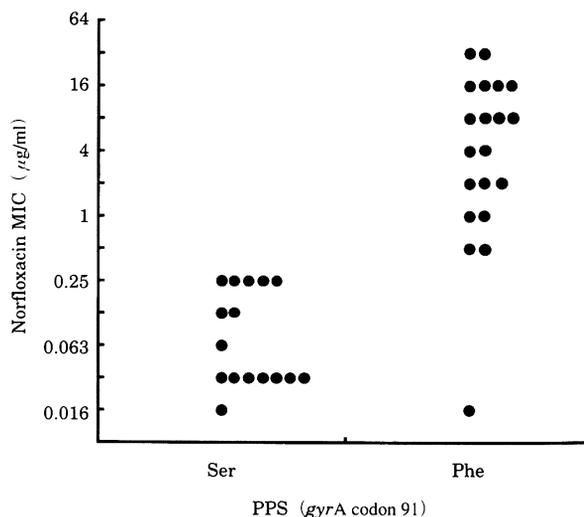


Fig. 3. Correlation between MIC of norfloxacin (NFLX) against *Neisseria gonorrhoeae* and amino acid of *gyrA* at codon 91 of *N. gonorrhoeae*.

Table 3. Comparison of *Neisseria gonorrhoeae* in *gyrA* at codon 91 between PPS and culture

		PPS	
		+	-
Culture	+	36 (16, 20)	0
	-	2 (2, 0)	18

感染症患者に対する pazufloxacin の治療効果と分離菌の *gyrA* および *parC* 変異との関係のみたものでは *gyrA* codon 91 において serine から phenylalanine の変異がみられた株は著明に除菌率が低いことがわかる<sup>16)</sup>。すなわちこの変異を調べることはニューキノロン薬の治療効果を予測する上で重要であると思われる。

そこでわれわれは今回患者検体から直接 *N. gonorrhoeae* の *gyrA* codon 91 のアミノ酸変異を検出する方法を開発し基礎的および臨床的検討を行った。その結果培養によって *N. gonorrhoeae* を検出した患者検体は本法ですべて陽性を示した。また培養で陰性であった 20 検体中 2 例は本法では陽性となった。残り陰性の 18 検体はアンプリコアによる PCR でも陰性であったことから本法の検出精度はきわめて高いものと考えられる。PPS 法で判定した *gyrA* codon 91 の変異は培養法で分離した株の Cycle Sequence 法による *gyrA* の成績と比べ、1 例を除きすべて一致した。不一致であったこの 1 例より分離された株に対し PPS 法を行った結果、*gyrA* codon 91 のアミノ酸は serine であることが判明した。また本菌株に対する NFLX の MIC は 0.016  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と明らかな感受性株である。これら両法の結果の差異を明らかにすることは不可能であるが、おそらく患者検体中に wild type strain (感性株) と *gyrA* 変異株 (耐性株) が混在しており、後者は培養法では検出できずに PPS 法によってのみ検出し得たものと推測される。この現象は過去にわれわれが報告した同一臨床材料中に存在する薬剤感受性株と耐性株の混在<sup>17)</sup>が本菌感染症にも当てはまるものと思われる。

他方、*N. gonorrhoeae* の直接検出法についてはいくつかの手法<sup>18-21)</sup>がありキット化され臨床で応用されている。しかし今回われわれが開発した PPS 法は *N. gonorrhoeae* の検出に加えニューキノロン薬耐性因子の 1 つである *gyrA* の変異の有無を 1 検査工程で実施可能な方法である。また判定も前述のとおり色調の変化で読み取る簡便かつ正確な方法である。以上のことから PPS 法は淋菌感染症患者微量検体から *N. gonorrhoeae* を迅速かつ高精度に検出し、その患者にニューキノロン薬の治療を行う場合、その有効性を予測する上できわめて有用な方法であることが示唆された。

#### 文 献

- 1) 性病。感染症マニュアル (小早川隆敏編), p.163~165, マイガイア, 東京, 1997
- 2) 小島弘敬: 最近のわが国の STD = 現状と治療指針 =。日本医師会雑誌 11: 1905~1910, 1997
- 3) 熊本悦明, 塚本泰司, 岩澤晶彦: クラミジアの影にエイズあり—従来の STD と HIV 感染との関連性。臨床と微生物 24: 387~396, 1997
- 4) 小島弘敬: 各科領域の STD 泌尿器科—東京。臨床と微生物 24: 407~414, 1997
- 5) Tanaka M, Matsumoto T, Kobayashi I, et al.: Emergence of in vitro resistance to fluoroquinolones in *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Japan. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 2367~2370, 1995
- 6) Tanaka M, Kumazawa J, Matsumoto T, et al.: High prevalence of *Neisseria gonorrhoeae* strains with reduced susceptibility to fluoroquinolones in Japan. Genitourin Med. 70: 90~93, 1994
- 7) Deguchi T, Yasuda M, Asano M, et al.: DNA gyrase mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 561~563, 1995
- 8) Prober J M, Trainor G L, Dam R J, et al.: A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. Science 238: 336~341, 1987
- 9) Lee L G, Connell C R, Woo S L, et al.: DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. Nucleic Acids Research 20: 2471~2483, 1992
- 10) Knapp J S, Rice R J: *Neisseria* and *Branhamella*. In Manual of Clinical Microbiology (Murray P R, Baron E J, Pfaller M A, et al. ed.), p.324~340, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1995
- 11) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighth Informational Supplement. NCCLS document M 100-S 8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 1998
- 12) 坂 義人, 出口 隆, 河田幸道: 各科領域の STD 泌尿器科—岐阜。臨床と微生物 24: 415~420, 1997
- 13) Tanaka M, Sakuma S, Takahashi K, et al.: Analysis of quinolone resistance mechanisms in *Neisseria gonorrhoeae* isolates in vitro. Sex. Transm. Infect. 74: 59~62, 1998
- 14) Ison C A, Woodfoad P J, Madders H, et al.: Drift in susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to ciprofloxacin and emergence of therapeutic failure. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2919~2922, 1998
- 15) Belland R J, Morrison S G, Ison C, et al.: *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *parC* in fluoroquinolone-resistant isolates. Mol. Microbiol. 14: 371~380, 1994
- 16) Tanaka M, Matsumoto T, Sakumoto M, et al.: Reduced clinical efficacy of pazufloxacin against gonorrhoea due to high prevalence of quinolone-resistant isolates with the GyrA mutation. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 579~582, 1998
- 17) 小林寅祐, 長谷川美幸, 内野卯津樹, 他: 各種の臨床分離菌のコロニーレベルにおける生物学的性状と薬剤感受性 (II) 緑膿菌について。Chemotherapy 39: 753~760, 1991
- 18) Panke E S, Yang L I, Leist P A, et al.: Comparison of Gen-Probe DNA probe test and culture for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in endocervical specimens. J. Clin. Microbiol. 29: 883~888, 1991
- 19) Kehl S C, Georgakas K, Swain G R, et al.: Evaluation of the Abbott LCx assay for detection of *Neisseria gonorrhoeae* in endocervical swab specimens

- from females. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3549~3551, 1998
- 20) Kacena K A, Quinn S B, Hartman S C, et al.: Pooling of urine samples for screening for *Neisseria gonorrhoeae* by ligase chain reaction: Accuracy and application. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3624~3628, 1998
- 21) Bassiri M, Mardh P A, Domeika M, et al.: Multiplex AMPLICOR PCR screening for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in women attending non-sexually transmitted disease clinics. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2556~2560, 1997

### Direct detection of fluoroquinolone-resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in clinical specimens

Akiko Kanayama<sup>1)</sup>, Mitsunobu Shimadzu<sup>2)</sup>, Miyuki Hasegawa<sup>1)</sup>,  
Takeshi Saika<sup>1)</sup> and Intetsu Kobayashi<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Chemotherapy Division, Mitsubishi-Kagaku Bio-Clinical Laboratories, Shimura 3-30-1, Itabashi-ku, Tokyo 174-8555, Japan

<sup>2)</sup>Department of Genetics, Mitsubishi-Kagaku Bio-Clinical Laboratories

Gonococcal fluoroquinolone-resistance is now a significant problem in Japan. Mutation at serine-91 in the gonococcal *gyrA* gene is commonly identified in quinolone resistant isolates. We found a new method for direct detection of *gyrA* mutation in *Neisseria gonorrhoeae* in clinical isolates using pin-point sequencing. A wild strain of *N. gonorrhoeae* (T-25) highly susceptible to fluoroquinolones (FQs) and five mutant strains resistant to FQs were used as the test strains. The T-25 strain and five mutant strains of *N. gonorrhoeae* and other species of bacteria (*a*-hemolytic *Streptococcus*, coagulase (-) *Staphylococcus* and *Escherichia coli*) were each suspended in sterile distilled water at  $10^4$ ~ $10^5$  CFU/ml. PCR-amplification of the *gyrA* gene fragment of *N. gonorrhoeae* was performed with a codon 91 adjacent primer. Aliquots of PCR products were used for detection of single base substitution at codon 91 by pin-point sequencing. The signals of the fluorescein-labeled products were detected by ELISA. From 56 clinical specimens, this method was successfully applied to detect the fluoroquinolone-resistant cells of *N. gonorrhoeae*. There was one exception. These results suggest that this method is useful for the detection of fluoroquinolone-resistant strains in *N. gonorrhoeae* from clinical specimens directly.