

ニューキノロン系薬耐性 *Neisseria gonorrhoeae* に関する基礎的および臨床的検討

田中正利

九州大学医学部泌尿器科*

(平成 11 年 6 月 22 日受付・平成 11 年 7 月 1 日受理)

わが国における *Neisseria gonorrhoeae* のニューキノロン (new quinolone: NQ) 系薬に対する耐性化状況、およびその耐性機序について検討した。

1. *N. gonorrhoeae* の NQ 系薬耐性化状況

529 株 (1981~1984 年分離 27 株, 1993~1994 年分離 151 株, 1995~1996 年分離 154 株, および 1997~1998 年分離 197 株) の *N. gonorrhoeae* に対する NQ 系薬をはじめとする各種薬剤の MIC 値を測定した。Norfloxacin, ciprofloxacin (CPFX), levofloxacin, および sparfloxacin の 1997~1998 年分離 *N. gonorrhoeae* 197 株に対する MIC₉₀ 値は, 1981~1984 年分離 27 株に対するそれより 64~256 倍も高い値を示し, *N. gonorrhoeae* の NQ 系薬に対する耐性化が顕著であった。NQ 系薬耐性株 (CPFX MIC₉₀ ≥ 1 μg/ml) の検出率は, 1981~1984 年の 0% (0/27) から年々上昇し, 1997~1998 年では 24.4% (48/197) と有意に高い検出率を示した。一方, β-ラクタム系薬をはじめとする NQ 系薬以外の薬剤に対する耐性化は明らかではなかった。1995~1996 年分離 *N. gonorrhoeae* 116 株における栄養要求型と NQ 系薬耐性化の関係を検討した。CPFX の proline 要求型に対する MIC₉₀ 値は 2 μg/ml で, prototrophic や arginine 要求型など他の栄養要求型に対するそれより 8~512 倍も高い値を示した。すなわち, proline 要求型が NQ 系薬に耐性化を示した。

2. *N. gonorrhoeae* の NQ 系薬耐性機序

CPFX の MIC 値が 0.125~0.5 μg/ml に分布する NQ 系薬中等度耐性 *N. gonorrhoeae* 36 株のうち, 25 株は DNA gyrase subunit A (GyrA) のみのキノロン耐性決定領域 (quinolone resistance-determining region: QRDR) にアミノ酸変化を有し, また, 11 株は GyrA と topoisomerase IV *parC*-encoded subunit (ParC) の両酵素の QRDR にアミノ酸変化を有していた。CPFX の MIC 値が 1~16 μg/ml に分布する耐性 29 株はすべて GyrA に 2 か所のアミノ酸変化を有し, それに加え ParC に 1 か所または 2 か所のアミノ酸変化を有していた。GyrA においては 91 番目の serine (Ser)→phenylalanine (Phe) 変化, また ParC においては 88 番目の Ser→proline 変化の頻度が高かった。なお, ParC のみにアミノ酸変化を有する株は検討した 128 株中 1 株も認められなかった。これらのことより, *N. gonorrhoeae* の NQ 系薬耐性獲得には GyrA におけるアミノ酸変化が重要で, ParC におけるアミノ酸変化は高度耐性化に関係していると考えられた。

Pazufloxacin (PZFX) を 1 回 200 mg, 1 日 3 回, 3 日間経口投与した男子淋菌性尿道炎における *N. gonorrhoeae* 消失率は 66.7% (28/42) と低く, 臨床的にも *N. gonorrhoeae* の NQ 系薬耐性化は明らかであった。PZFX 投与後, 野生型および GyrA の 75 番目, または 95 番目にアミノ酸変化を有する株はすべて消失したものの, GyrA の Ser-91→Phe 変化を有する株の消失率は 21.4% と低く, また, GyrA に 2 か所のアミノ酸変化を有する株, および GyrA と ParC の両者にアミノ酸変化を有する株は 1 株も消失しなかった。

Key words: *Neisseria gonorrhoeae*, new quinolones, resistance, DNA gyrase, topoisomerase IV

Neisseria gonorrhoeae 感染症は古くから知られた代表的な性感染症で, 現在欧米先進諸国では減少傾向にあるものの, 発展途上国においては依然として蔓延している。わが国における *N. gonorrhoeae* 感染症は 1980 年半ばのいわゆるエイズ騒動の影響で一時激減していたが, 最近増加傾向が認められる¹⁾。本感染症に対する治療においては, 1984 年以降

臨床の現場に次々に登場したニューキノロン (new quinolone: NQ) 系薬がペニシリンナーゼ産生淋菌 (penicillinase-producing *N. gonorrhoeae*: PPNG) を含む *N. gonorrhoeae* に強い抗菌力を示すことにより繁用され, 良好な臨床効果を示していた。しかしながら最近, わが国をはじめとする極東アジア諸国において本系薬に耐性を示す *N. gonorrhoeae* の

増加が深刻な問題になっている⁹⁻¹¹。そこで、わが国における *N. gonorrhoeae* の NQ 系薬に対する耐性化状況ならびにその耐性機序について検討したので報告する。

I. 対象と方法

1. *N. gonorrhoeae* の NQ 系薬耐性化状況

1) 各種薬剤に対する感受性の年次推移

1993~1994年に分離された151株、1995~1996年に分離された154株、1997~1998年に分離された197株、および1981~1984年に分離された対照株27株、合計529株の男子尿道炎由来 *N. gonorrhoeae* に対する各種薬剤の MIC 値をアメリカ法に準じた寒天平板希釈法にて測定し⁹、その年次推移を検討した。接種菌量は 10^6 cfu/ml とし、 β -lactamase 産生能はアシドメトリ法 (ベータチェック, ファイザー社) で測定した。使用薬剤は NQ 系薬 4 剤 (norfloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin, sparfloxacin), および各種系統の 5 剤 (penicillin G, ceftriaxone, tetracycline, azithromycin, spectinomycin) の合計 9 剤であった。

2) NQ 系薬耐性 *N. gonorrhoeae* の年次推移

次に、アメリカ法の判定基準にもとづく NQ 系薬耐性 *N. gonorrhoeae* の検出率における年次推移を検討した。アメリカ法においては、ciprofloxacin の MIC 値が $1 \mu\text{g/ml}$ 以上を耐性、 $0.125 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ を中等度耐性、 $0.06 \mu\text{g/ml}$ 以下を感受性とすることが、Knapp ら⁷により提唱されている。

3) NQ 系薬耐性と栄養要求型

1995~1996年に分離された154株の *N. gonorrhoeae* のうち、1~116番目に分離された116株についてその栄養要求型と ciprofloxacin に対する感受性の関係を検討した。栄養要求型別は Catlin ら⁸の方法に準じて行った。すなわち、すべての *N. gonorrhoeae* はその発育に cystine または cysteine を要求することが知られているが、変異によりさらに多くのアミノ酸を要求するものがある。このアミノ酸要求パターンを栄養要求型といい、*N. gonorrhoeae* の疫学調査に用いる。Cystine または cysteine のみを要求する株を prototrophic (proto) とし、以下、arginine, histidine, leucine, lysine, methionine, proline, hypoxanthine, および uracil の要求性によりタイピングした。

2. *N. gonorrhoeae* におけるキノロン耐性機序

1) 基礎的検討

N. gonorrhoeae の NQ 系薬耐性化には、本系薬の標的酵素である DNA gyrase subunit A (GyrA) および topoisomerase IV の parC-encoded subunit (ParC) のキノロン耐性決定領域 (quinolone resistance-determining region: QRDR) におけるアミノ酸変化が密接に関係していることが報告されている⁹⁻¹²。また、一部の耐性株では薬剤の菌体内蓄積量の低下も耐性化に関係していることが明らかにされている¹³⁻¹⁷。そこで、アメ

リカ法の基準で ciprofloxacin に感受性を示す 63 株、中等度耐性を示す 36 株、および耐性を示す 29 株、合計 128 株の *N. gonorrhoeae* 株を対象に、それらの GyrA および ParC の QRDR におけるアミノ酸変化を、われわれがすでに報告した PCR 法および direct sequence 法にて解析した¹⁰。そして、さきに述べた 4 剤の NQ 系薬に、最近新たに開発された pazufloxacin, prulifloxacin, grepafloxacin, trovafloxacin, gatifloxacin, DU-6859 a, HSR-903, および BAY 12-8039 の 8 剤を加えた合計 12 剤のこれら *N. gonorrhoeae* に対する MIC 値を測定し、GyrA および ParC におけるアミノ酸変化とこれら薬剤に対する感受性の関係を検討した。

2) 臨床的検討

1994年6月から12月までに九州大学泌尿器科およびその関連施設を受診した42例の男子淋菌性尿道炎患者 (平均年齢30歳) に pazufloxacin を原則として1回200 mg, 1日3回, 3日間投与し、本薬の有効性, 安全性を検討した¹⁰。また、本薬投与前後で分離された *N. gonorrhoeae* に対する本薬の MIC 値を寒天平板希釈法で測定した。さらに、それら分離株の GyrA および ParC の QRDR におけるアミノ酸変化の解析をわれわれがすでに報告した方法¹⁰で行い、菌消失率と MIC 値の関係, 菌消失率と GyrA および ParC におけるアミノ酸変化の関係, および GyrA および ParC におけるアミノ酸変化と MIC 値の関係について検討した。

なお、統計学的解析は χ^2 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

II. 結 果

1. *N. gonorrhoeae* の NQ 系薬耐性化状況

1) 各種抗菌薬に対する感受性の年次推移

臨床分離 *N. gonorrhoeae* に対する各種薬剤の MIC 値における年次推移を Table 1 に示した。NQ 系薬の norfloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin, および sparfloxacin の 1993~1994 年分離株に対する MIC₉₀ 値は、NQ 系薬がほとんど臨床で使用されていなかった 1981~1984 年に分離された株に対するそれより 2 または 4 倍高い値を示した。1997~1998 年分離株に対する MIC₉₀ 値も 1981~1984 年分離株に対する値より 4 倍高い値を示した。また、それら薬剤の MIC₉₀ 値は年々上昇し、1997~1998 年分離株に対する MIC₉₀ 値は、1981~1984 年分離株に対するそれより 64~256 倍も高い値を示した。一方、 β -ラクタム系薬をはじめとする NQ 系薬以外の薬剤の 1997~1998 年分離株に対する MIC₉₀ 値は、1981~1984 年分離株に対する値と同等かそれより低い値を示し、また、1997~1998 年分離株に対する MIC₉₀ 値も、1981~1984 年分離株に対するそれより 4 倍以上高い値を示すことはなかった。このように *N. gonorrhoeae* の NQ 系薬に対する耐性化は年々進行し、特に 1997~1998 年に分離された株において耐性化が顕

Table 1. Change in the susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates to various antibiotics

| Antibiotic | Year | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | |
|---------------------------|-----------|---------------------------------|-----------------------|--------------------|
| | | 50% | 90% | range |
| Norfloxacin | 1981~1984 | 0.063 | 0.25 | 0.004-2 |
| | 1993~1994 | 0.25 (4 \times) ^a | 4 (16 \times) | 0.004-8 |
| | 1995~1996 | 0.25 (4 \times) | 8 (32 \times) | 0.016-16 |
| | 1997~1998 | 0.25 (4 \times) | 16 (64 \times) | 0.016-32 |
| Ciprofloxacin | 1981~1984 | 0.008 | 0.063 | $\leq 0.001-0.25$ |
| | 1993~1994 | 0.031 (4 \times) | 0.5 (8 \times) | $\leq 0.001-1$ |
| | 1995~1996 | 0.031 (4 \times) | 1 (16 \times) | 0.004-16 |
| | 1997~1998 | 0.031 (4 \times) | 8 (128 \times) | 0.002-16 |
| Levofloxacin | 1981~1984 | 0.016 | 0.031 | 0.002-0.125 |
| | 1993~1994 | 0.031 (2 \times) | 0.25 (8 \times) | $\leq 0.001-0.5$ |
| | 1995~1996 | 0.063 (4 \times) | 1 (32 \times) | 0.008-8 |
| | 1997~1998 | 0.063 (4 \times) | 8 (256 \times) | 0.004-16 |
| Sparfloxacin | 1981~1984 | 0.004 | 0.016 | $\leq 0.001-0.063$ |
| | 1993~1994 | 0.016 (4 \times) | 0.125 (8 \times) | $\leq 0.001-0.5$ |
| | 1995~1996 | 0.063 (16 \times) | 0.25 (16 \times) | $\leq 0.001-8$ |
| | 1997~1998 | 0.016 (4 \times) | 2 (128 \times) | 0.002-8 |
| Penicillin G ^b | 1981~1984 | 1 | 2 | 0.063-2 |
| | 1993~1994 | 0.25 (0.25 \times) | 2 (1 \times) | 0.008-2 |
| | 1995~1996 | 0.125 (0.125 \times) | 1 (0.5 \times) | 0.016-2 |
| | 1997~1998 | 0.25 (0.25 \times) | 2 (1 \times) | 0.031-4 |
| Ceftriaxone | 1981~1984 | 0.016 | 0.063 | 0.002-0.063 |
| | 1993~1994 | 0.016 (1 \times) | 0.063 (1 \times) | $\leq 0.001-0.25$ |
| | 1995~1996 | 0.016 (1 \times) | 0.125 (2 \times) | $\leq 0.001-0.125$ |
| | 1997~1998 | 0.008 (0.5 \times) | 0.125 (2 \times) | $\leq 0.001-0.25$ |
| Tetracycline | 1981~1984 | 1 | 4 | 0.25-4 |
| | 1993~1994 | 0.5 (0.5 \times) | 1 (0.25 \times) | 0.063-8 |
| | 1995~1996 | 0.25 (0.25 \times) | 1 (0.25 \times) | 0.063-4 |
| | 1997~1998 | 0.25 (0.25 \times) | 2 (0.5 \times) | 0.063-2 |
| Azithromycin | 1981~1984 | 0.125 | 0.25 | 0.031-0.5 |
| | 1993~1994 | 0.063 (0.5 \times) | 0.25 (1 \times) | 0.008-1 |
| | 1995~1996 | 0.063 (0.5 \times) | 0.125 (0.5 \times) | 0.016-0.5 |
| | 1997~1998 | 0.125 (1 \times) | 0.25 (1 \times) | 0.016-1 |
| Spectinomycin | 1981~1984 | 16 | 16 | 8-32 |
| | 1993~1994 | 8 (0.5 \times) | 8 (0.5 \times) | 2-16 |
| | 1995~1996 | 8 (0.5 \times) | 16 (1 \times) | 4-16 |
| | 1997~1998 | 8 (0.5 \times) | 16 (1 \times) | 4-16 |

27 isolates from 1981 to 1984, 151 from 1993 to 1994, 154 from 1995 to 1996, and 197 from 1995 to 1996 were tested.

^aNumbers in parentheses indicate fold changes as compared to the MIC for isolates from 1981 to 1984.

^bOnly non-PPNG strains were tested.

著であった。

2) NQ系薬耐性 *N. gonorrhoeae* の年次推移

NQ系薬耐性 *N. gonorrhoeae* 検出率の年次推移を Fig. 1 に示した。耐性株 (CPFAX MIC $\geq 1 \mu\text{g/ml}$) の検出率は、1981~1984年では0% (0/27), 1993~1994年では6.6% (10/151), 1995~1996年では15.6% (24/

154), および 1997~1998年では24.4% (48/197) と年々上昇し、1997~1998年における検出率は1981~1984年におけるそれに比べ、有意に高い値を示した ($p < 0.0001$)。なお、耐性株と中等度耐性株 (CPFAX MIC が $0.125\sim 0.5 \mu\text{g/ml}$) を合わせた株の検出率においては、1993~1994年以降有意な上昇は認められなかつ

た。

3) 栄養要求型とNQ系薬耐性

1995~1996年分離の *N. gonorrhoeae* 116株におけるアミノ酸要求型と ciprofloxacin に対する感受性の関係を Table 2 に示した。 *N. gonorrhoeae* のアミノ酸要求型は, proto が 39.7% でもっとも多く, 次に proline 要求型が 29.3% で多く, 以下, arginine 要求型 25.9%, arginine-hypoxanthine-uracil 要求型 2.6%, proline-hypoxanthine 要求型 1.7%, および arginine-hypoxanthine 要求型 0.9% の順であった。 Ciprofloxacin の proline 要求型に対する MIC₅₀ 値は 0.25 μg/ml であり, 他の型に対するそれより 4~64 倍高い値を示した。 また, その MIC₅₀ 値は 2 μg/ml であり, 他の型に対するそれより 8~512 倍も高い値を示した。 このように, proline 要求型が ciprofloxacin に強い耐性を示した。

2. *N. gonorrhoeae* におけるNQ系薬耐性機序

1) 基礎的検討

Table 3 に臨床分離 *N. gonorrhoeae* 128株の GyrA および ParC の QRDR におけるアミノ酸変化を示した。 Ciprofloxacin の MIC 値が 0.004~0.063 μg/ml に分布する感受性 63 株中 26 株においては, GyrA の 1 か所のみアミノ酸変化が認められた。 頻度の高いアミノ酸変化は 95 番目の aspartic acid (Asp)→glycine または

asparagine (Asn), および 75 番目の alanine→serine (Ser) などであった。 Ciprofloxacin の MIC 値が 0.125~0.5 μg/ml に分布する中等度耐性 36 株のうち, 23 株は GyrA の 1 か所のみアミノ酸変化を有し, 2 株は GyrA に 2 か所のアミノ酸変化を有し, また, 9 株は GyrA および ParC においてそれぞれ 1 か所アミノ酸変化を有していた。 さらに, 残りの 2 株は GyrA および ParC に合わせて 3 か所のアミノ酸変化を有していた。 なお, 1 株を除いたすべての株が GyrA に Ser-91→phenylalanine (Phe) 変化を有していた。 Ciprofloxacin の MIC 値が 1~16 μg/ml に分布する耐性 29 株はすべて GyrA に 2 か所のアミノ酸変化を有し, それに加え ParC に 1 か所または 2 か所のアミノ酸変化を有していた。 これら 29 株中 28 株は GyrA に Ser-91→Phe および Asp-95→Asn 変化を有していた。 また, ParC においては Ser-88→proline 変化の頻度がもっとも高かった。 なお, ParC のみにアミノ酸変化を有する株は検索した 128 株中 1 株も認められなかった。

次に *N. gonorrhoeae* の GyrA および ParC におけるアミノ酸変化と各種NQ系薬に対する感受性の関係を Table 4 に示した。 各種NQ系薬の GyrA のみにアミノ酸変化を有する株に対する MIC₅₀ 値, MIC₉₀ 値は, 野生型に対するそれよりそれぞれ 4~16 倍, 8~64 倍高い値を示した。 各種NQ系薬の GyrA と ParC の両者にアミノ酸変化を有する株に対する MIC₅₀ 値, MIC₉₀ 値は, 野生型に対するそれよりそれぞれ 32~256 倍, 64~1,024 倍も高い値を示し, また GyrA のみにアミノ酸変化を有する株に対するそれより高い値を示した。 すなわち, GyrA と ParC の両者にアミノ酸変化を有する株は, 野生型や GyrA のみにアミノ酸変化を有する株に比べ, NQ系薬に対する耐性が高かった。 なお, GyrA におけるアミノ酸変化別に感受性をみると Ser-91→Phe へのアミノ酸変化を有する株の感受性がすべてのNQ系薬に対してもっとも低かった。

2) 臨床的検討

男子淋菌性尿道炎に対する pazufloxacin 投与による *N. gonorrhoeae* 消失率は 66.7% (28/42) と低かった。

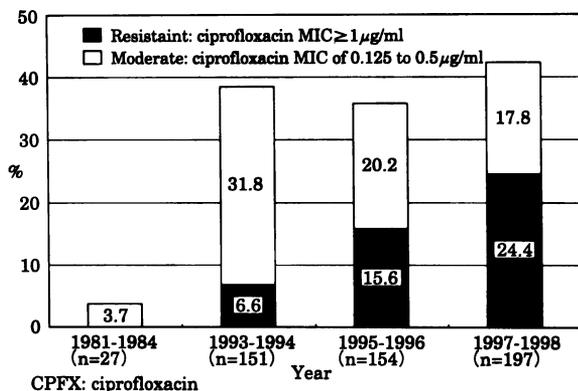


Fig. 1. Change in the prevalence rate of fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*.

Table 2. Relationship between auxotype and ciprofloxacin susceptibility in *Neisseria gonorrhoeae*

| Auxotype | No. of isolates (%) | Ciprofloxacin MIC (μg/ml) | | |
|----------|---------------------|---------------------------|-------|-------------|
| | | 50% | 90% | range |
| Proto | 46 (39.7) | 0.031 | 0.25 | 0.004-8 |
| Pro | 34 (29.3) | 0.25 | 2 | 0.008-16 |
| Arg | 30 (25.9) | 0.008 | 0.063 | 0.004-0.063 |
| AHU | 3 (2.6) | 0.004 | 0.004 | 0.004 |
| Pro-Hypo | 2 (1.7) | 0.063 | 0.125 | 0.063-0.125 |
| Arg-Hypo | 1 (0.9) | 0.008 | 0.008 | 0.008 |

Proto: prototrophic, Pro: proline-requiring, Arg: arginine-requiring, AHU: arginine, hypoxanthine, and uracil-requiring, Pro-Hypo: proline and hypoxanthine-requiring, Arg-Hypo: arginine and hypoxanthine-requiring.

Table 3. Amino acid substitution within the QRDR of GyrA and ParC in 128 isolates of *Neisseria gonorrhoeae*

| Ciprofloxacin MIC ($\mu\text{g/ml}$) (No. of isolates tested) | GyrA | | | | | ParC | | | | | | No. of isolates |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------------|
| | 67 Ala | 75 Ala | 84 Ala | 91 Ser | 95 Asp | 86 Asp | 87 Ser | 88 Ser | 91 Glu | 92 Ala | 116 Arg | |
| 0.004 - 0.063 (n = 63) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 37 |
| | Ser | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| | - | Ser | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 5 |
| | - | - | Pro | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| | - | - | - | Phe | - | - | - | - | - | - | - | 2 |
| | - | - | - | Cys | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| | - | - | - | - | Gly | - | - | - | - | - | - | 11 |
| | - | - | - | - | Asn | - | - | - | - | - | - | 5 |
| 0.125 - 0.5 (n = 36) | - | - | - | Phe | - | - | - | - | - | - | - | 23 |
| | - | - | - | Phe | Gy | - | - | - | - | - | - | 1 |
| | - | - | - | Phe | Asn | - | - | - | - | - | - | 1 |
| | - | - | - | Tyr | - | - | - | - | - | - | His | 1 |
| | - | - | - | Phe | - | Asn | - | - | - | - | - | 7 |
| | - | - | - | Phe | - | - | - | - | - | Gly | - | 1 |
| | - | - | - | Phe | - | - | - | Pro | Gly | - | - | 1 |
| | - | - | - | Phe | Asn | - | - | Pro | - | - | - | 1 |
| 1 - 16 (n = 29) | - | - | - | Phe | Asn | - | - | Pro | - | - | - | 17 |
| | - | - | - | Phe | Gly | - | - | - | Gly | - | - | 1 |
| | - | - | - | Phe | Asn | - | Arg | Pro | - | - | - | 5 |
| | - | - | - | Phe | Asn | - | Ile | Pro | - | - | - | 1 |
| | - | - | - | Phe | Asn | - | - | Pro | Gly | - | - | 1 |
| | - | - | - | Phe | Asn | - | - | Pro | Gln | - | - | 1 |
| | - | - | - | Phe | Asn | - | - | Pro | Lys | - | - | 3 |

Ala: alanine, Ser: serine, Asp: aspartic acid, Glu: glutamic acid, Arg: arginine, Pro: proline, Phe: phenylalanine, Cys: cysteine, Gly: glycine, Asn: asparagine, Tyr: tyrosine, His: histidine, Ile: isoleucine, Gln: glutamine, Lys: lysine.

Pazufloxacin の MIC 値と菌消失率の関係を Table 5 に示した。本薬の MIC 値は 0.006~12.5 $\mu\text{g/ml}$ まで幅広い分布を示した。MIC 値が 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以下の株はすべて消失したものの、MIC 値が 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 以上の株における消失率はわずか 22.2% であった。*N. gonorrhoeae* の GyrA および ParC におけるアミノ酸変化と菌消失率の関係を Table 6 に示した。検討できた 41 株中 15 株 (36.6%) のみが野生型であり、残りの 26 株 (63.4%) は GyrA のみに、または GyrA と ParC の両者にアミノ酸変化を有していた。Pazufloxacin 投与後、野生型および GyrA の 75 番目、または 95 番目にアミノ酸変化を有する株はすべて消失したものの、GyrA に Ser-91→Phe 変化を有する株の消失率は 21.4% と低く、また、GyrA に 2 か所のアミノ酸変化を有する株、GyrA と ParC の両者にアミノ酸変化を有する株は 1 株も消失しなかった。複数のアミノ酸変化を有する株はすべて GyrA に Ser-91→Phe 変化を有していた。GyrA に Ser-91→Phe 変化を有する株に対する pazufloxacin の平均 MIC 値 (0.86 $\mu\text{g/ml}$) は、野生型に対するそれ (0.013

$\mu\text{g/ml}$) より 66 倍も高い値を示し、また他の GyrA に 1 か所のアミノ酸変化を有する株に対する平均 MIC 値より高い値を示した。さらに、GyrA に Ser-91→Phe 変化を有する株に対する norfloxacin, ciprofloxacin の平均 MIC 値も同様の傾向が認められた (Table 7)。

III. 考 察

NQ 系薬は、PPNG およびテトラサイクリン耐性株などを含めた *N. gonorrhoeae* に強い抗菌力を示すことより、わが国をはじめ世界各国で *N. gonorrhoeae* 感染症に対する第一選択薬として使用されてきた。ところが、最初の NQ 系薬である norfloxacin が一般臨床に登場した 2 年後の 1986 年には、オランダで Wagenvoort ら¹⁹⁾ が、enoxacin が無効であった尿道炎患者から本薬の MIC 値が 2.0 $\mu\text{g/ml}$ の耐性株を分離したことをはじめて報告した。続いて 1988 年には Joyce ら²⁰⁾ がフィリピンにおいて ciprofloxacin に対する MIC 値が 0.5 $\mu\text{g/ml}$ の株を分離したことを報告した。そして 1990 年代になり世界各国から NQ 系薬に耐性を示す *N. gonorrhoeae* の分離が相次いで報告されはじめた²¹⁻²⁴⁾。われわれも

Table 4. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates, classified by the presence of amino acid substitution in GyrA and ParC to fluoroquinolones

| Antibiotic | Type of amino acid substitution (No. of isolates) | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | |
|---------------|---------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------|--------------------|
| | | 50% | 90% | range |
| Norfloxacin | Wild type (20) | 0.031 | 0.063 | 0.008-0.063 |
| | GyrA alone (43) | 0.5 (16 \times) ^a | 4 (64 \times) | 0.063-4 |
| | GyrA and ParC (22) | 8 (256 \times) | 16 (256 \times) | 0.5-16 |
| Ciprofloxacin | Wild type (20) | 0.008 | 0.008 | 0.004-0.016 |
| | GyrA alone (43) | 0.063 (8 \times) | 0.5 (64 \times) | 0.008-0.5 |
| | GyrA and ParC (22) | 2 (256 \times) | 8 (1,024 \times) | 0.125-16 |
| Levofloxacin | Wild type (20) | 0.008 | 0.016 | 0.008-0.016 |
| | GyrA alone (43) | 0.125 (16 \times) | 0.5 (32 \times) | 0.016-0.5 |
| | GyrA and ParC (22) | 2 (256 \times) | 8 (512 \times) | 0.25-16 |
| Sparfloxacin | Wild type (20) | 0.004 | 0.008 | \leq 0.001-0.008 |
| | GyrA alone (43) | 0.063 (16 \times) | 0.125 (16 \times) | 0.008-0.5 |
| | GyrA and ParC (22) | 0.25 (64 \times) | 4 (512 \times) | 0.125-8 |
| Pazufloxacin | Wild type (20) | 0.016 | 0.016 | 0.008-0.063 |
| | GyrA alone (43) | 0.125 (8 \times) | 0.5 (32 \times) | 0.031-1 |
| | GyrA and ParC (22) | 4 (256 \times) | 16 (1,024 \times) | 0.5-16 |
| Prulifloxacin | Wild type (20) | 0.008 | 0.008 | 0.002-0.031 |
| | GyrA alone (43) | 0.063 (8 \times) | 0.5 (64 \times) | 0.008-0.5 |
| | GyrA and ParC (22) | 0.5 (64 \times) | 8 (1,024 \times) | 0.125-8 |
| Grepafloxacin | Wild type (20) | 0.004 | 0.008 | \leq 0.001-0.063 |
| | GyrA alone (43) | 0.031 (8 \times) | 0.125 (16 \times) | 0.008-0.5 |
| | GyrA and ParC (22) | 0.25 (64 \times) | 4 (512 \times) | 0.063-4 |
| Trovafloxacin | Wild type (20) | 0.008 | 0.008 | \leq 0.001-0.031 |
| | GyrA alone (43) | 0.063 (8 \times) | 0.25 (32 \times) | 0.004-0.5 |
| | GyrA and ParC (22) | 0.5 (64 \times) | 8 (1,024 \times) | 0.063-8 |
| Gatifloxacin | Wild type (20) | 0.008 | 0.008 | 0.002-0.008 |
| | GyrA alone (43) | 0.031 (4 \times) | 0.063 (8 \times) | 0.008-0.5 |
| | GyrA and ParC (22) | 0.5 (64 \times) | 2 (256 \times) | 0.031-2 |
| DU-6859 a | Wild type (20) | 0.002 | 0.004 | \leq 0.001-0.004 |
| | GyrA alone (43) | 0.008 (4 \times) | 0.031 (8 \times) | \leq 0.001-0.063 |
| | GyrA and ParC (22) | 0.063 (32 \times) | 0.25 (64 \times) | 0.008-0.25 |
| HSR-903 | Wild type (20) | 0.002 | 0.004 | \leq 0.001-0.004 |
| | GyrA alone (43) | 0.008 (4 \times) | 0.031 (8 \times) | \leq 0.001-0.063 |
| | GyrA and ParC (22) | 0.063 (32 \times) | 0.5 (128 \times) | 0.008-0.5 |
| BAY 12-8039 | Wild type (20) | 0.008 | 0.008 | 0.002-0.063 |
| | GyrA alone (43) | 0.063 (8 \times) | 0.125 (16 \times) | 0.016-1 |
| | GyrA and ParC (22) | 0.5 (64 \times) | 4 (512 \times) | 0.063-4 |

^aNumbers in parentheses indicate fold change as compared with MIC for wildtype.

1992~1993年にわが国において分離された *N. gonorrhoeae* は、NQ系薬に耐性化を示すことをすでに報告したが^{2,3)}、今回の検討において *N. gonorrhoeae* のNQ系薬に対する耐性化はさらに進行していた。今回われわれは、1993~1998年までの6年間に分離された *N.*

gonorrhoeae を2年ごとにまとめ、その薬剤感受性をNQ系薬がほとんど臨床で使用されていなかった1981~1984年に分離された *N. gonorrhoeae* のそれと比較検討した。その結果、*N. gonorrhoeae* のNQ系薬に対する耐性化は年々進行していた。また、1997~1998年

Table 5. Relationship between MIC and bacteriological response to pazufloxacin treatment

| | MIC ($\mu\text{g/ml}$) for <i>N. gonorrhoeae</i> isolates: | | | | | | | | | | | | | Total |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------|-------|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|--------------------|-------|
| | 0.006 | 0.013 | 0.025 | 0.05 | 0.1 | 0.2 | 0.39 | 0.78 | 1.56 | 3.13 | 6.25 | 12.5 | N.D. ^{a)} | |
| Bacteriological response ^{b)} | 2/2 | 12/12 | 1/1 | 3/3 | 5/5 | 2/3 | 1/5 | 1/3 | 0/4 | 0/2 | 0/0 | 0/1 | 1/1 | 28/42 |
| (%) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 66.7 | 20 | 33.3 | 0 | 0 | | 0 | 100 | 66.7 |

^{a)}Not determined, ^{b)}No. of isolates eradicated/no. of isolates

Table 6. Relationship between amino acid substitution in GyrA and ParC in *Neisseria gonorrhoeae* and bacteriological response to pazufloxacin

| Amino acid substitution | | Total no. of isolates | Bacteriological response | |
|-------------------------|------------|-----------------------|--------------------------|------------|
| GyrA | ParC | | eradicated | persistent |
| Wild type | Wild type | 15 | 15 (100) | 0 |
| Ala-75→Ser | Wild type | 5 | 5 (100) | 0 |
| Ser-91→Phe | Wild type | 14 | 3 (21.4) | 11 (78.6) |
| Asp-95→Asn | Wild type | 2 | 2 (100) | 0 |
| Asp-95→Gly | Wild type | 2 | 2 (100) | 0 |
| Ser-91→Phe/Asp-95→Gly | Wild type | 1 | 0 (0) | 1 (100) |
| Ser-91→Phe/Asp-95→Gly | Glu-91→Gly | 1 | 0 (0) | 1 (100) |
| Ser-91→Phe/Asp-95→Asn | Ser-88→Pro | 1 | 0 (0) | 1 (100) |

Table 7. Relationship between amino acid substitution in GyrA and ParC and the pazufloxacin MIC for *Neisseria gonorrhoeae*

| Amino acid substitution | | No. of isolates | Mean MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | |
|-------------------------|------------|-----------------|-------------------------------|-------------|---------------|
| GyrA | ParC | | pazufloxacin | norfloxacin | ciprofloxacin |
| Wild type | Wild type | 15 | 0.013 | 0.032 | 0.007 |
| Ala-75→Ser | Wild type | 5 | 0.08 | 0.14 | 0.019 |
| Ser-91→Phe | Wild type | 14 | 0.86 | 1.72 | 0.28 |
| Asp-95→Asn | Wild type | 2 | 0.2 | 0.59 | 0.075 |
| Asp-95→Gly | Wild type | 2 | 0.075 | 0.3 | 0.038 |
| Ser-91→Phe/Asp-95→Gly | Wild type | 1 | 3.13 | 3.13 | 0.39 |
| Ser-91→Phe/Asp-95→Gly | Glu-91→Gly | 1 | 3.13 | 12.5 | 3.13 |
| Ser-91→Phe/Asp-95→Asn | Ser-88→Pro | 1 | 12.5 | 12.5 | 3.13 |

分離株における NQ 系薬耐性 *N. gonorrhoeae* の検出率は 24.4% というきわめて高い値を示した。最近、欧米諸国をはじめ世界各国でも NQ 系薬耐性淋菌は検出されている。その検出率は、欧米先進国の米国²⁵⁾、英国²⁶⁾ではそれぞれ 0.04%、0.4%、中国、香港、韓国ではほぼ 15~25%、また、カンボジア、フィリピンではほぼ 50~65% と報告されている⁵⁾。すなわち、わが国をはじめとする東南アジアにおいて NQ 系薬耐性 *N. gonorrhoeae* の蔓延が著しいことがわかる。なお、今回の検討では PPNG 検出率は年々低下傾向を示し、またテトラサイクリン系薬耐性 *N. gonorrhoeae* はほとんど検出されなかった。最近、NQ 系薬の使用量が増え、ペニシリン系薬、テトラサイクリン系薬の使用量が低下しているためと考えられる。欧米先進国と比べ、わが国でこの

ように NQ 系薬耐性 *N. gonorrhoeae* が蔓延しているのは、本感染症に対する薬剤の投与法に大きな問題があるためと推定される。すなわち、欧米では第三世代のセフェム系薬、spectinomycin などの注射薬はもちろんのこと、NQ 系薬などの経口薬もその十分量を 1 回のみ投与し、確実に *N. gonorrhoeae* を除菌する単回療法が普及している。しかしながら、わが国では NQ 系薬をはじめとする経口薬の単回療法はほとんど行われておらず、1 日投与量を 2~3 回に分け、7~14 日間程度連続投与するケースが多い。この投与法の問題点は、数回の服薬後症状がある程度軽快した際、まだ完治していないにもかかわらず服薬の忘れや自己判断による服薬の中断が起りやすく、その結果生き残った *N. gonorrhoeae* が薬剤耐性を獲得し、拡散して行く可能性があることである。

この投与方法がわが国で急速に進行している *N. gonorrhoeae* の NQ 系薬耐性化の主な原因の 1 つと推定される。

次に、われわれは淋菌の疫学的マーカーの 1 つである栄養要求型に着目し、NQ 系薬耐性化と栄養要求型の関係を検討した。その結果、proline 要求型を示す株が NQ 系薬に耐性化を示すことが明らかになった。以前われわれが調べた 1992 年分離株の栄養要求型の頻度は、proto が 84.4% で圧倒的に高く、proline 要求型は 4.4% のみであった。しかし今回の検討においては、proto の頻度は 39.7% と減少し、proline 要求型が 29.3% と増加した。すなわち、NQ 系薬耐性 *N. gonorrhoeae* の増加と proline 要求型の増加に関連がみられた。proline 要求型が NQ 系薬に耐性化を示す理由は現在明らかになっておらず、今後検討を要する課題と考えられた。

N. gonorrhoeae のキノロン系薬耐性機序に関する基礎的検討により、アメリカ法の基準で NQ 系薬に耐性または中等度耐性とされる 65 株中 64 株 (98.5%) が Ser-91→Phe 変化を有し、GyrA における各種アミノ酸変化と NQ 系薬に対する感受性の関係でも Ser-91→Phe 変化を有する株がもっとも感受性が低いことが判明した。また、ParC のみにアミノ酸変化を有する株は検索した 128 株中 1 株も認められなかった。これらの結果より、*N. gonorrhoeae* においては GyrA がキノロン系薬の primary target であり、特に GyrA における Ser-91→Phe へのアミノ酸変化が耐性獲得においてももっとも重要な変化であると考えられた。そして、GyrA のアミノ酸変化に ParC におけるアミノ酸変化が加わることにより、*N. gonorrhoeae* が NQ 系薬に対し高度耐性を獲得すると考えられた。なお、*N. gonorrhoeae* の GyrA における Ser-91 は *Escherichia coli* の GyrA における Ser-83 に相当し⁹⁾、耐性獲得においてもっとも重要な部位であることが知られている。また、pazufloxacin に臨床的に耐性を示す *N. gonorrhoeae* も、すべて GyrA において Ser-91→Phe 変化を有することが判明した。さらに、最近分離した sparfloxacin および levofloxacin に臨床的に耐性を示す *N. gonorrhoeae* においてもこの同じアミノ酸変化が検出された^{16,17)}。これらの事実より GyrA において Ser-91→Phe 変化を有する株が臨床的にも NQ 系薬耐性 *N. gonorrhoeae* と考えられる。したがって、治療前に *N. gonorrhoeae* が GyrA に Ser-91→Phe 変化を有するかどうかを迅速・簡便に確認できれば、NQ 系薬の適応を考える上できわめて有用な情報となる。そこでわれわれは、PCR 法と酵素抗体法を応用し、患者の尿道分泌物中の *N. gonorrhoeae* を培養することなく、分泌物から直接 *N. gonorrhoeae* の GyrA における Ser-91→Phe 変化を検出できる迅速診断を開発し²⁷⁾、現在、臨床的検討を行っている。

今回の研究よりわが国においては *N. gonorrhoeae* の NQ 系薬耐性化が急速に進行していることが判明し、さらなる NQ 系薬耐性淋菌の蔓延を防ぐことが急務である。すなわち、*N. gonorrhoeae* 感染症における NQ 系薬の乱用を慎むとともに、わが国の実情にあった本感染症の治療に関する新しいガイドライン作成が必要である。

文 献

- 1) 田中正利: 淋菌性尿道炎の病態の変遷. *Curr. Conc. in Infect. Dis.* 18: 12~15, 1999
- 2) Tanaka M, Kumazawa J, Matsumoto, et al.: High prevalence of *Neisseria gonorrhoeae* strains with reduced susceptibility to fluoroquinolones in Japan. *Genitourin. Med.* 70: 90~93, 1994
- 3) 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
- 4) Tanaka M, Nakayama H, Kobayashi I, et al.: Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Fukuoka City, Japan, in the early 1980s and 1997~1998: Emergence of high-level fluoroquinolone-resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 722~723, 1999
- 5) Ison C A, Dillon J A C, Tapsall J W: The epidemiology of global antibiotic resistance among *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus ducreyi*. *Lancet* 351 (suppl III): 8~11, 1998
- 6) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Villanova, PA: NCCLS, Approved standard M7-A 3, 1993
- 7) Knapp J S, Hales J A, Neal S W, et al.: Proposed criteria for interpretation of susceptibilities of strains of *Neisseria gonorrhoeae* to ciprofloxacin, ofloxacin, enoxacin, lomefloxacin, and norfloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2442~2445, 1995
- 8) Catlin B W: Nutritional profiles of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, and *Neisseria lactamica* in chemically defined media and the use of growth requirements for gonococcal typing. *J. Infect. Dis.* 128: 178~194, 1973
- 9) Belland R J, Morrison S G, Ison C A, et al.: *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *parC* in fluoroquinolone-resistant isolates. *Mol. Microbiol.* 14: 371~380, 1994
- 10) Tanaka M, Otsuki M, Nishino T, et al.: Mutation in DNA gyrase of norfloxacin-resistant clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. *Genitourin. Med.* 72: 295~297, 1996
- 11) Tanaka M, Takahashi K, Saika T, et al.: Development of fluoroquinolone resistance and mutations involving GyrA and ParC proteins among *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Japan. *J. Urol.* 159: 2215~2219, 1998

- 12) Deguchi T, Yasuda M, Nakano M, et al.: Quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*: correlation of alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV with antimicrobial susceptibility profiles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1020~1023, 1996
- 13) Corkill J E, Percival A, Lind M.: Reduced uptake of ciprofloxacin in a resistant strain of *Neisseria gonorrhoeae* and transformation of resistance to other strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 28: 601~604, 1991
- 14) Tanaka M, Fukuda H, Hirai K, et al.: Reduced uptake and accumulation of norfloxacin in resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Japan. *Genitourin. Med.* 70: 253~255, 1994
- 15) Tanaka M, Sakuma S, Takahashi K, et al.: Analysis of quinolone resistance mechanisms in *Neisseria gonorrhoeae* isolates in vitro. *Sex. Transm. Inf.* 74: 59~62, 1998
- 16) Tanaka M, Nakayama H, Haraoka M, et al.: Analysis of quinolone resistance mechanisms in a sparfloxacin-resistant clinical isolate of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex. Transm. Dis.* 25: 489~493, 1998
- 17) Tanaka M, Sagiyama K, Haraoka M, et al.: Genotypic evolution in a quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated from a patient with clinical failure of levofloxacin treatment. *Uro. Int.* 62: 64~68, 1999
- 18) 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
- 19) Wagenvoort J H, van der Willigen A H, van Vliet H J, et al.: Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to enoxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 18: 429, 1986
- 20) Joyce M P, Aying B B, Vaughan G H, et al.: In vitro sensitivity of *Neisseria gonorrhoeae* to fluoroquinolone antibiotics in the Republic of the Philippines. Presented at the 6th International Pathogenic *Neisseria* Conference; Callaway Gardens, GA, Oct 16-21, 1988; Abstract E 19.
- 21) Gransden W R, Warren C A, Phillips I, et al.: Decreased susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to ciprofloxacin. *Lancet.* 335 (8680): 51, 1990
- 22) Knapp J S, Washington J A, Doyle L J, et al.: Persistence of *Neisseria gonorrhoeae* strains with decreased susceptibilities to ciprofloxacin and ofloxacin in Cleveland, Ohio, from 1992 through 1993. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2194~2196, 1994
- 23) Kam K M, Lo K K, Ho N K, et al.: Rapid decline in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Hong Kong associated with emerging 4-fluoroquinolone resistance. *Genitourin. Med.* 71: 141~144, 1995
- 24) Tapsall J W, Phillips E A, Shultz T R, et al.: Quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Sydney, Australia, 1991 to 1995. *Sex. Transm. Dis.* 23: 425~428, 1996
- 25) Fox K K, Knapp J S, Holmes K K, et al.: Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the United States, 1988-1994: the emergence of decreased susceptibility to the fluoroquinolones. *J. Infect. Dis.* 175: 1396~1403, 1997
- 26) Ison C A, Martin I M C, the London Gonococcal Working Group: Susceptibility of gonococci isolated in London to therapeutic antibiotics: establishment of a London surveillance programme. *Sex. Transm. Inf.* 75: 107~111, 1999
- 27) 金子明子, 小林寅詰, 西田 実, 他: *gyrA* 変異 *Neisseria gonorrhoeae* の迅速検出に関する検討. 第46回日化療総会, 抄録番号 140, 和歌山.

Basic and clinical study on fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*

Masatoshi Tanaka

Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyusyu University 3-1-1,
Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8582, Japan

We examined the prevalence of fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Japan and the quinolone-resistance mechanisms in the organisms.

1. The prevalence of fluoroquinolone-resistant *N. gonorrhoeae*

The antimicrobial susceptibility of a total of 529 gonococcal isolates, including 27 from 1981 to 1984, 151 from 1993 to 1994, 154 from 1995 to 1996, and 197 from 1997 to 1998, to various agents were tested. The susceptibility of *N. gonorrhoeae* to fluoroquinolones has been decreasing dramatically during the observation period. The MIC₉₀ of norfloxacin, ciprofloxacin (CPFX), levofloxacin, and sparfloxacin for the 197 gonococcal isolates from 1997 to 1998 were 64- to 256-fold higher than those for the 27 isolates between 1981 and 1984. The prevalence of fluoroquinolone-resistant *N. gonorrhoeae* isolates (MIC of CPFX $\geq 1 \mu\text{g/ml}$) increased remarkably. The prevalence rate (24.4%) of the fluoroquinolone-resistant *N. gonorrhoeae* isolates from 1997 to 1998 was significantly higher than that (0%) between 1981 and 1984 ($p < 0.001$). However, there were no significant changes in the susceptibility of the isolates to various antimicrobial agents other than fluoroquinolones. We also evaluated the relationship between auxotype and fluoroquinolone resistance in *N. gonorrhoeae*. The MIC₉₀ of CPFX for the proline-requiring isolates was 8- to 512-fold higher than that for the other auxotype such as the argentine-requiring isolates or prototrophic type.

2. The quinolone resistance mechanisms in *N. gonorrhoeae*

Of 36 *N. gonorrhoeae* isolates moderately resistant to CPFX (MIC of 0.125 to 0.5 $\mu\text{g/ml}$), 25 contained amino acid substitutions within the quinolone resistance-determining region (QRDR) of DNA gyrase subunit A (GyrA) alone and the remaining 11 contained amino acid substitutions in the QRDRs of GyrA and topoisomerase IV parC-encoded subunit (ParC). All 29 isolates resistant to CPFX (MIC $\geq 1 \mu\text{g/ml}$) had a double amino acid substitution at position 91 and 95 in the QRDR of GyrA combined with a single or double substitution in the QDRD of ParC. The most frequently identified alteration was a serine (Ser) to phenylalanine (Phe) at position 91 in GyrA and that was a serine to proline at position 88 in ParC. No single alteration in ParC, without the simultaneous presence of a resistance alteration in GyrA, was identified. These data suggest that alterations in GyrA play a central role in conferring fluoroquinolone resistance to *N. gonorrhoeae*, and that alterations in ParC play a complementary role in the development of fluoroquinolone resistance.

Male patients with gonococcal urethritis were treated with an oral dose of 200 mg of pazufloxacin 3 times daily for 3 days. Of 42 gonococcal isolates only 28 (66.7%) were eradicated. The relationship between bacteriological response to pazufloxacin and alterations in GyrA and ParC was evaluated. All the wild-type isolates and the isolate containing a single amino acid substitution at position 75 or 95 were eradicated after pazufloxacin treatment. However, eradication rates in the isolates with a Ser-91 to Phe alteration in GyrA and multiple alterations in GyrA and ParC were 21.4% and 0%, respectively.