

東邦大学審査学位論文（博士）

緑膿菌臨床分離株におけるフルオロキノロン耐性に関する研究

2014 年

東邦大学大学院薬学研究科

小 林 秀 樹

緑膿菌臨床分離株におけるフルオロキノロン耐性に関する研究

2014 年

東邦大学大学院薬学研究科

小 林 秀 樹

目次							
第一章	序論	・	・	・	・	・	1
第二章	緑膿菌臨床分離株の薬剤感受性	・	・	・	・	・	12
	第1節	結果	・	・	・	・	12
	第2節	考察	・	・	・	・	18
第三章	緑膿菌臨床分離株の薬剤耐性機構	・	・	・	・	・	20
	第1節	フルオロキノロン耐性機構	・	・	・	・	20
	第1節	結果	・	・	・	・	21
	第2節	考察	・	・	・	・	33
	第2節	薬剤排出ポンプの機能亢進による耐性	・	・	・	・	37
	第1節	結果	・	・	・	・	38
	第2節	考察	・	・	・	・	41
	第3節	Efflux Pump Inhibitor (EPI) によるMIC値への影響	・	・	・	・	42
	第1節	結果	・	・	・	・	43
	第2節	考察	・	・	・	・	46
第四章	緑膿菌臨床分離株の薬剤耐性の進化	・	・	・	・	・	49
	第1節	結果	・	・	・	・	49
	第2節	考察	・	・	・	・	54
第五章	総括	・	・	・	・	・	57
第六章	使用菌株・試薬・実験操作	・	・	・	・	・	62
	第1節	実験材料	・	・	・	・	62
	第1節	使用菌株	・	・	・	・	62
	第2節	プライマー	・	・	・	・	62
	第3節	使用培地	・	・	・	・	63
	第4節	使用緩衝液	・	・	・	・	64
	第5節	使用抗菌薬	・	・	・	・	64
	第6節	遺伝子操作用、電気泳動用試薬	・	・	・	・	64
	第7節	使用機器	・	・	・	・	65
	第8節	その他	・	・	・	・	65

第二節	実験方法	66
第1節	MIC値測定	66
第2節	DNA Sequencing	68
第3節	Efflux Pump Inhibitor (EPI) を用いたMIC値測定	73
第4節	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) PCR	74
第5節	Hypermotabilityの確認	76
第七章	参考文献	78
	謝辞	85

## 第一章 序論

### I. 緑膿菌

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) はグラム陰性好気性桿菌で芽胞を形成しない。*Pseudomonas* 属の代表菌種で、大きさ  $0.5\sim 0.8\times 1.5\sim 3.0\mu\text{m}$ 、一端に1本まれに2~3本の鞭毛をもつ。単染色でよく染まる。わずかの有機物と水分が存在すれば増殖でき、土中、水中など、広く自然界に分布し、ヒトの皮膚、腸管内にも存在する。ブドウ糖を酸化的に分解して酸を産生するが発酵は行わない。水溶性色素であるフルオレセイン fluorescein (蛍光性黄緑色) とピオシアニン pyocyanine (青緑色) を産生するものもある。また、外毒素やムコイドの産生、様々な抗菌薬に対する自然耐性という特徴を持つ<sup>(1)</sup>。

### II. 抗緑膿菌薬の開発経緯と耐性機構の研究

化学療法剤の使用に伴い、必ずその薬剤に対する耐性を獲得した細菌が出現するという問題は、緑膿菌においても例外ではない。1970年に緑膿菌に有効な抗菌薬としてゲンタマイシン (GM) が認可された。しかし、間もなく、GMに耐性を示す臨床分離菌が出現し<sup>(2)</sup>、GM耐性菌にも有効なアミノ配糖体としてアミカシン (1977) やイセパマイシン (1988) が開発されて来た。一方、緑膿菌は、染色体依存性に産生するセファロスポリナーゼ (AmpC) により、ペニシリンやセファゾリンなどの初期のセファロスポリンに自然耐性を示すため、この酵素に安定な $\beta$ -ラクタム薬として、ピペラシリン (1980)、セフスロジン (1980)、セフトジジム (1986) などが次々と開発され、臨床に投入されてきた。さらに、イミペネム (1987) などのカルバペネム系抗菌薬も開発され、緑膿菌感染症に対し強力な援軍となった。他方、シプロフロキサシン (1988) や

レボフロキサシン（1993）などのフルオロキノロン系薬も相次いで開発されるなど、緑膿菌による急性感染症は、化学療法によるコントロール可能な事例も多いと考えられ、1980年代からのMRSA の出現と蔓延の中で、ともするとその危険性が軽視され忘れられがちとなっていた。

しかし、1970年代後半から、前述したように、プラスミド依存性にアミカシンに耐性を獲得した緑膿菌が内外で出現し<sup>(3)</sup>、さらに、1980年代の後半にはイミペネムをはじめ広範な広域β-ラクタム薬に耐性を示す緑膿菌がわが国で出現するなど<sup>(4)</sup>、緑膿菌感染症に対する化学療法の有効性が揺らぎはじめています。

現在、臨床分離される緑膿菌の数%がアミカシンに耐性を獲得しており、一方イミペネムなどのカルバペネム薬に耐性を獲得した緑膿菌は、約2割に及ぶとされている。また、レボフロキサシン、シプロフロキサシンなどのフルオロキノロン薬に耐性を獲得した緑膿菌も2割程度を占めるのが一般的な状況となっている<sup>(5)</sup>。イミペネム耐性菌では、フルオロキノロンやアミノ配糖体に同時に耐性を獲得した株も散見されている。このように、キノロン薬の抗菌力、抗菌スペクトルの改良には作用機序および耐性機構の研究が大きく貢献している。

### Ⅲ. 緑膿菌の医療現場における位置づけ

緑膿菌のビルレンスは弱く、健康人に対しては感染を起こすことは比較的少ない。しかしながら、易感染性患者の多い医療施設内では、医療従事者から患者へ、また、患者から患者へと伝播・拡散するため、院内感染や院内感染症の起原菌として問題となっている。さらに、血液中に侵入するとエンドトキシンによるショックや多臓器不全（MOF）を誘発し、患者が死亡する場合もあるため警戒が必要な菌である。また、常在菌としての性格が強い菌であるが、入院患者、特に高齢者で感染防御能力が低下した方々が多く収容される医療施設で

は、日和見感染症の起因細菌として問題となっている<sup>(6)</sup>。

緑膿菌が産生するムコイドの主成分は、アルギン酸とよばれる粘性の高いムコ多糖で、一部の緑膿菌では、この分泌されたムコイドが菌体を覆い包むバイオフィルムを形成する<sup>(7,8)</sup>。緑膿菌はバイオフィルムの内部で増殖し、生存している。またバイオフィルムの内部には消毒薬や抗菌薬などが浸透しにくいだけでなく、白血球による貪食や抗体、補体などの宿主の免疫機構による排除から逃れやすくなり、治療も困難になる。このことから、バイオフィルムの形成は緑膿菌の薬剤耐性機構の一つに位置付けられている。

バイオフィルム形成のほかに、医療現場において緑膿菌による感染症の治療が困難になる原因に、抗菌薬の不活化酵素の産生があげられる。どの抗菌薬にどのように抵抗するかと言う遺伝情報（薬剤耐性遺伝子）は、多くの場合、病原菌の細胞質内で自律的に増殖できる環状 DNA（プラスミド）に存在し、保存されている。このような薬剤耐性遺伝子を保持するプラスミドには接合伝達能をもつ伝達性薬剤耐性プラスミド（R プラスミド : drug resistance plasmid）と接合伝達能を持たない非伝達性プラスミドに分類することができる。伝達性プラスミドはグラム陰性細菌に広く認められるが、グラム陽性細菌では腸球菌や *Bacillus* 属の細菌に見られる程度である<sup>(9)</sup>。抗菌薬に対する耐性機構はその種類によって異なるが、重要な耐性機構の一つは、やはり  $\beta$ -ラクタマーゼによる  $\beta$ -ラクタム系（ペニシリン系及びセファロスポリン系）抗菌薬の不活化であると考えられる<sup>(10)</sup>。現在まで  $\beta$ -ラクタマーゼを産生する菌に対抗するため、色々な手段がとられてきた。例えば、メチシリンやオキサシリン等および第 3 世代セファロスポリンなどの、より分解されにくい  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬や  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害薬（クラブラン酸、スルバクタム）との合剤等の開発が挙げられる。しかしながら、近年従来のもものと比較してより多くの基質（ $\beta$ -ラクタ



ム系抗菌薬)を分解できる ESBLs (Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamases) と総称される  $\beta$ -ラクタマーゼが分離され<sup>(11)</sup>、ヨーロッパ諸国及び米国において新たな耐性菌、特に院内感染の原因菌として問題になりつつある。このような国外の現状に加えて、日本国内においては国外とは異なった状況が明らかになってきた。すなわち、後述するようなメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の出現、伝播である。 $\beta$ -ラクタマーゼは酵素活性の中心にセリン残基を持つセリン- $\beta$ -ラクタマーゼと、酵素活性の中心にセリン残基を持たず、金属イオンである  $Zn^{2+}$ を有するメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼに大別される。

Table. 1  $\beta$ -ラクタマーゼの分類(日本ベクトン・ディッキンソン HP より引用)

セリン- $\beta$ -ラクタマーゼ
<p><b>1. クラス A <math>\beta</math>-ラクタマーゼ (ペニシリナーゼ)</b></p> <p>ペニシリンを良く分解するので、ペニシリナーゼとも呼ばれている。産生する菌は、ペニシリン系及び第 1、第 2 世代セファロスポリン等を分解するが、セファマイシン系、第 3 世代セファロスポリン及びカルバペネム系抗菌薬は分解せず感受性を示す。</p> <p>グラム陰性桿菌が産生する R プラスミド性のクラス A <math>\beta</math>-ラクタマーゼは、その遺伝子型から更に TEM 型、SHV 型等に分類される。尚、例外的に <i>Klebsiella pneumoniae</i> 及び <i>Proteus vulgaris</i> はこの遺伝子を染色体上に持っており、アンピシリンに自然耐性を示す。</p>
<p><b>2. クラス C <math>\beta</math>-ラクタマーゼ (セファロスポリナーゼ)</b></p> <p>腸内細菌、<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 等のグラム陰性桿菌が産生し、主にセファロスポリン系抗菌薬を分解する。</p>
<p><b>3. クラス D <math>\beta</math>-ラクタマーゼ (OXA 型)</b></p> <p>腸内細菌、<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 等のグラム陰性桿菌が産生し、ペニシリナーゼの範疇に入るが、オキサシリンも分解するのでこのように呼ばれている。</p>
メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (亜鉛- $\beta$ -ラクタマーゼ)
<p><b>4. クラス B <math>\beta</math>-ラクタマーゼ (カルバペネマーゼ)</b></p> <p>イミペネムを効率よく分解し、更にその他のカルバペネム系抗菌薬 (パニペネム、メロペネム) に対しても、中もしくは高度の耐性を示すのでこのように呼ばれている。</p> <p>染色体性、プラスミド性含め、<i>Bacteroides fragilis</i>、<i>Serratia marcescens</i>、<i>Klebsiella pneumoniae</i>、<i>Escherichia coli</i> 等複数のグラム陰性菌で確認されている。</p>

A~D の4つのクラスに分類されるβ-ラクタマーゼのうちクラス A、C、D はセリン-β-ラクタマーゼに属し、クラス B はメタロ-β-ラクタマーゼに属する。まとめると上記のようになる (Table. 1)。

また、欧米で問題視されている ESBLs については、大腸菌や *Klebsiella pneumoniae* のペニシリナーゼ遺伝子の変異して、セファロスポリン系抗菌薬を分解するようになったβ-ラクタマーゼに、更に変異が加わったために酵素の基質となるβ-ラクタム系抗菌薬の種類が増えたので、このような名前が付けられている。ESBLs 産生菌に対してはセファロスポリン系及びモノバクタム系抗菌薬が使用できない可能性があるので、結果として、治療に使用できる抗菌薬が極めて限定されることになる。ESBLs 産生菌出現の背景としては、TEM 及び SHV 型と呼ばれていた典型的なペニシリナーゼ遺伝子を保持する細菌が各種のβ-ラクタム系抗菌薬に暴露された結果、少しずつ変異してこれら各種抗菌薬を分解する能力を獲得し、その結果として、本来このタイプのペニシリナーゼには安定なはずの第3世代セファロスポリン系抗菌薬やモノバクタム系抗菌薬を分解するようになったと考えられている<sup>(12)</sup>。日本国内における ESBLs についての状況は、TEM 型を産生する耐性菌の分離についての報告は殆どなく<sup>(13)</sup>、Toho 型の分離報告<sup>(14,15)</sup>以外、今のところ院内感染等において大きな問題とはなっていないようである。但し、今後の動向には細心の注意を払う必要があると考える。加えて、前述したように国内では別のβ-ラクタマーゼがきわめて大きな問題となりつつある。それは欧米の場合と異なり、カルバペネム系抗菌薬の大量使用の産物と考えられるメタロ-β-ラクタマーゼ 『特に IMP-1 型：カルバペネマーゼ遺伝子 (*bla* IMP) を有する』産生菌の出現、伝播<sup>(16)</sup>と言う状況である。メタロ-β-ラクタマーゼは第3世代セフェムだけでなく、イミペネムをはじめとするカルバペネム系抗菌薬をも分解してしまい、最も危険なβ-ラクタマー

ぜと考えられている。そしてこの酵素を産生する菌が、既に複数の施設で分離されている(17,18)。カルバペネマーゼであるということは、単剤では全てのβ-ラクタム系抗菌薬が効果を示さない（ペニシリンやセファロスポリンを非常に良く分解するものもある）ということであり、更に厄介なことに現在使用されているβ-ラクタマーゼ阻害薬も全く効果を示さない(10,19)。また、これらの耐性遺伝子保持菌株に対するアミノグリコシド系及びフルオロキノロン系など他の抗菌薬の効果についても、未だ確固たるデータが無い。

各種β-ラクタマーゼに加え、伝達性キノロン耐性遺伝子の存在が1998年 Martinez らによって明らかにされた(20)。このプラスミドにコードされる伝達性のキノロン耐性遺伝子は *qnr* と命名され、インテグロンと呼ばれるモバイルエレメント内に存在することも示された。*qnr* がコードするタンパク質 Qnr のアミノ酸配列から、このタンパク質は Pentapeptide Repeat Family に属していることが明らかとされた。Qnr はキノロン薬の DNA-DNA ジャイレースとの Cleavable Complex 形成を何らかの形でブロックし、*qnr* 保有株にキノロン耐性を付与しているものと考えられている(21)。

さらに緑膿菌の持つ高い薬剤耐性の原因の一つに、外膜の透過性の低さが挙げられる。

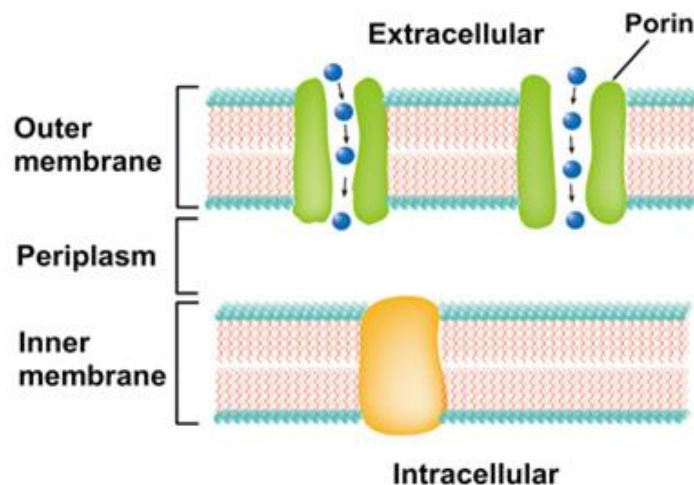


Figure. 1 グラム陰性菌の細胞壁 (日本蛋白質構造データバンク HP より引用)

グラム陰性菌では、抗生物質を含む低分子量の親水性物質は外膜に存在するチャンネルであるポリン孔を拡散通過することにより細胞内へ取り込まれる (Figure. 1)。しかし、緑膿菌は大腸菌など他のグラム陰性細菌と比較するとポリン孔径が小さく、そのため $\beta$ -ラクタムをはじめとする抗菌薬やその他の有機化合物の外膜透過性が十分の一から百分の一にまで減少している事が報告されている<sup>(22,23,24)</sup>。このように緑膿菌では外膜に存在するポリン孔の径が小さく、かつ他のグラム陰性細菌に比べて外膜ポリン数が少ないため、抗生物質をはじめとする有機物質などの異物は細胞内に透過しにくいため、さまざまな抗菌物質に対して耐性を示す。また、塩基性アミノ酸やイミペネムなどの選択的透過孔を形成する OprD ファミリータンパク質は代表的な特異性ポリンの一種であり、その減少によりイミペネム耐性となる<sup>(25)</sup>。また、外膜の透過性の低下と併せて、薬剤の排出亢進による耐性も重要な機構である。

緑膿菌のノルフロキサシン (NFLX) 耐性株の解析により、*nfxb*、*nfxc*、*nalB* 遺伝子に変異が起きることで外膜が変化し、野生株と比較して、NFLX の菌体内蓄積量が 1/2~1/3 に低下することが明らかにされた<sup>(26,27)</sup>。1995 年に Gotoh らは *nalB* 変異株の解析を行い、MexA-MexB-OprM の RND (Resistance-Nodulation-Cell Division) タイプの蛋白質がキノロン薬の排出に関与していることを明らかにした<sup>(28)</sup>。*mexA-mexB-oprM* オペロンにコードされた内膜から外膜に連なる 3 つの蛋白質 (MexA-MexB-OprM) の協力作用によりキノロン薬を菌体外に排出するモデルは、*nfxB*、*nfxC* 変異株でも明らかになり、それぞれ排出システム MexC-MexD-OprJ と MexE-MexF-OprN の発現亢進によりキノロン耐性が起きていると考えられた。このように *nfxB*、*nalB*、*nfxC* 変異株で新生もしくは増加した蛋白質は、それぞれ OprJ、OprM、OprN と呼ばれるようになった。その後の研究結果から *nfxB* 変異株では、*nfxB* が抑制

因子として機能しないため *mexC-mexD-oprJ* 遺伝子が過剰発現し、排出ポンプが過剰産生されるようになり、その結果キノロン薬が菌体外に能動排出されるというメカニズムが明らかとなった<sup>(29)</sup>。

さらに、緑膿菌の持つ高い薬剤耐性の原因の一つが、抗菌薬の作用部位の変化である。緑膿菌に対するフルオロキノロン系抗菌薬の標的酵素が、DNA の立体構造を変換する DNA ジャイレースであるという発見は、1977 年に Gellert らと Sugino らによりほぼ同時期に行われた<sup>(30,31)</sup>。DNA ジャイレースは、2 本鎖 DNA を同時に切断・再結合することにより DNA の立体構造を変化させ、DNA の複製・転写・組み換え・修復などに重要な役割を果たしている。この酵素は *gyrA* 遺伝子産物である subunit A (GyrA) 2 分子と *gyrB* 遺伝子産物である subunit B (GyrB) 2 分子からなるホロ酵素で、subunit A は DNA 鎖の切断・再結合作用、subunit B は ATPase 活性をもちエネルギー変換を担っている。フルオロキノロン系抗菌薬は subunit A に作用し DNA ジャイレース活性を阻害することも明らかになった。

Yoshida らの解析によると、緑膿菌と同じグラム陰性菌である大腸菌において、*gyrA* 変異部位は 875 個のアミノ酸からなる GyrA 蛋白の N 末端から 67~106 番目までの比較的狭い領域（キノロン耐性決定領域：QRDR）のアミノ酸に局在していた<sup>(32)</sup>。QRDR は DNA ジャイレースの作用により切断された DNA の 5' 末端と共有結合する部位である Tyr-122 に近傍している。QRDR の中でも 83 番目のアミノ酸である Ser-83 の近くに変異が集中しており、Ser-83 近傍がキノロン感受性に大きく関与する部位と考えられ、この領域が DNA と共有結合する部位に近いことから、subunit A, DNA, キノロンの 3 者が相互作用を示す部位と推定された<sup>(33)</sup>。その後に発表された DNA ジャイレースの X 線解析データから推定した分子モデルでもこの考えが裏付けられた。緑膿菌においても *gyrA* 遺

伝子におけるキノロン耐性変異部位が明らかにされているが、大腸菌同様 QRDR はよく保存されており、変異部位、アミノ酸変異もきわめて類似している。また、フルオロキノロン系抗菌薬の標的酵素である DNA ジャイレースの subunit A の変異による緑膿菌の耐性化が確認されており<sup>(34)</sup>、DNA ジャイレースの変異と TopoIV の変異が相俟って高度耐性化が起きることも推測される。

1990 年に染色体複製の最終段階の分配に働く新たな酵素を Kato らが発見した。この酵素のサブユニットのアミノ酸配列が DNA ジャイレースの subunit A、B と高いホモロジーがあることから TopoisomeraseIV (TopoIV) と名付けられた<sup>(35)</sup>。TopoIV は DNA ジャイレースと同様に細菌にとって必須の酵素であり、ParC および ParE の 2 つずつの計 4 つのサブユニットからなっている。TopoIV は複製後に絡み合った 2 本鎖 DNA の切断と再結合を行うことによって、分裂後の細胞に DNA を効率よく分配する役割を担っている。TopoIV もフルオロキノロン系抗菌薬により阻害されることが明らかとなった。

上記のように、緑膿菌は薬剤作用部位の変化、菌体外膜のポリン孔 (D2 ポリン) の減数や排出ポンプの過剰産生などの薬剤耐性機構 (Figure. 2) を備えており、医療現場においては注意を要する代表的な細菌と言える。

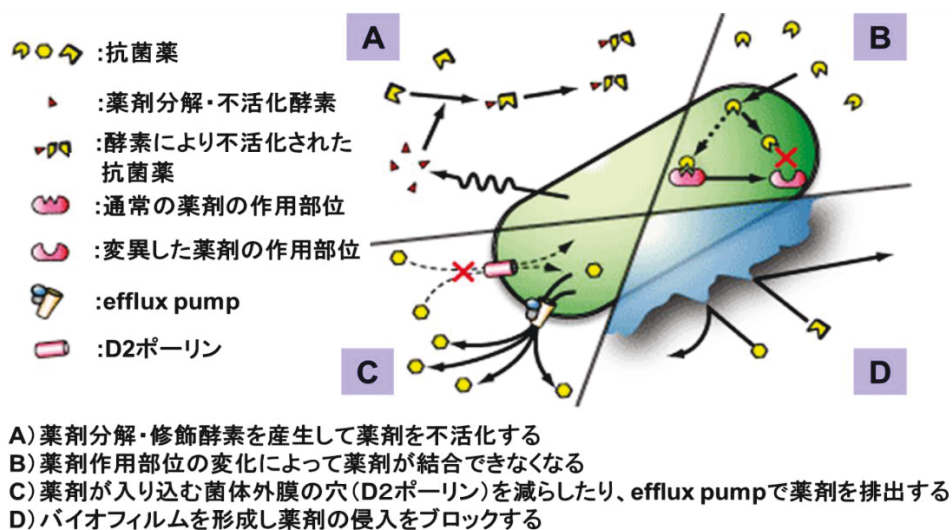


Figure. 2 緑膿菌の薬剤耐性メカニズム(大阪府立公衆衛生研究所 HP より引用)

#### IV. 目的

東邦大学医療センター大橋病院において、各種抗菌薬の投与期間が長期にわたる症例が存在している。このことはこれまで報告されている薬剤耐性菌株の出現を示唆するものであるが、臨床分離株における薬剤耐性機構などの詳細は不明である。

緑膿菌の強力な薬剤耐性機構は、プラスミドを介した外来性の耐性機構と、遺伝子の塩基配列の変異という内在性の耐性機構に大別される。

本研究では、東邦大学医療センター大橋病院の患者より分離されたフルオロキノロン系抗菌薬耐性緑膿菌における薬剤耐性と、その耐性メカニズムの1つといわれる“標的蛋白の変異”や“薬剤排出ポンプの機能亢進”との関連を明らかにすることを目的とする。

今回は、フルオロキノロン系抗菌薬の標的蛋白をコードする *gyrA*、*parC* の遺伝子と薬剤排出ポンプの機能亢進の調節に関与すると考えられる *mexR*、*mexZ*、*nfxB* の遺伝子について塩基配列を決定し、そこにコードされているアミノ酸配列の変異の有無を確認することで薬剤耐性との関連を検討する。

“薬剤排出ポンプの機能亢進”による薬剤耐性については、排出ポンプ阻害剤 (Efflux Pump Inhibitor : EPI) として phenylalanine arginyl  $\beta$ -naphthylamide を用いることで薬剤排出ポンプの過剰発現を検討する。

また、同一患者より得られた分離株の経時的な薬剤耐性の推移を見ることで、抗菌薬投与と薬剤耐性の関係を検討する。それに加えて複数株の緑膿菌の由来を鑑別するため Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) PCR を行い、同一株が経時的に薬剤耐性を獲得したのか、あるいは由来の異なる株が検出されたのかを判定する。

さらに、同一患者から初期に分離された分離株のうちキノロン感受性株につい

て変異頻度を測定し、薬剤耐性の出現に変異頻度の高い菌株（Hypermutable strain）が関与しているか検討する。



## 第二章 緑膿菌臨床分離株の薬剤感受性

2010年9月から2011年9月までに東邦大学医療センター大橋病院細菌検査室に提出された検体より分離された緑膿菌 373 株の基礎的情報として、各種抗菌薬に対する MIC を測定した。測定に用いた抗菌薬はフルオロキノロン系抗菌薬としてシプロフロキサシン(CPFX)、パズフロキサシン(PZFX)、アミノグリコシド系抗菌薬としてアミカシン(AMK)、カルバペネム系抗菌薬としてメロペネム(MEPM)である。

使用薬剤に対する感受性の判定は感染症新法での「多剤耐性緑膿菌」の判定基準である

- (1)カルバペネム系抗菌薬であるイミペネムの MIC 値 16 µg/mL 以上
- (2)アミノグリコシド系抗菌薬であるアミカシンの MIC 値 32 µg/mL 以上
- (3)フルオロキノロン系抗菌薬であるシプロフロキサシンの MIC 値 4 µg/mL 以上

を参考にした<sup>(36)</sup>。

また、薬剤排出ポンプによる薬剤耐性機構に着目する際の指標として、テトラサイクリン系抗菌薬であるミノサイクリン (MINO) の MIC を測定した。

### 第1節 結果

#### 1. フルオロキノロン系抗菌薬の MIC 値の分布

フルオロキノロン系抗菌薬である CPFX と PZFX の MIC 値の分布を以下に示す。入院患者由来および外来患者由来の分離株で分け、さらに「多剤耐性緑膿菌」の判定基準を参考に MIC 値を感受性・中等度耐性・高度耐性に分けて表記した (Table. 2、3)。

Table. 2 入院患者におけるフルオロキノロン系抗菌薬の MIC 値の分布

MIC 範囲	MIC 値 (μg/mL)		
	感受性	中等度耐性	高度耐性
	MIC < 3.91	3.91 ≤ MIC < 15.6	15.6 ≤ MIC
株数 (CPFEX)	250 (77.9%)	45 (14.0%)	26 (8.1%)
株数 (PZFX)	236 (73.5%)	35 (10.9%)	50 (15.6%)

Table. 3 外来患者におけるフルオロキノロン系抗菌薬の MIC 値の分布

MIC 範囲	MIC 値 (μg/mL)		
	感受性	中等度耐性	高度耐性
	MIC < 3.91	3.91 ≤ MIC < 15.6	15.6 ≤ MIC
株数 (CPFEX)	51 (98.0%)	0 (0.0%)	1 (1.9%)
株数 (PZFX)	49 (94.2%)	2 (3.8%)	1 (1.9%)

入院患者由来の緑膿菌 321 株のうち CPFEX に対して中等度、高度耐性を示した菌株数は、それぞれ 45 株 (14%)、26 株 (8.1%) であった。

## 2. 抗菌薬 3 剤に対する耐性・感受性の分布

多剤耐性緑膿菌の基準となる CPFEX、AMK、MEPM に対する耐性・感受性の分布を以下に示す。

外来患者由来の分離株と入院患者由来の分離株について、CPFEX、AMK、MEPM の MIC 値の結果から、感染症新法での「多剤耐性緑膿菌」の判定基準を参考に、

- (1) フルオロキノロン系抗菌薬 (CPFEX) : MIC 値 4μg/mL 以上
- (2) アミノグリコシド系抗菌薬 (AMK) : MIC 値 32μg/mL 以上
- (3) カルバペネム系抗菌薬 (MEPM) : MIC 値 16μg/mL 以上

の菌株を耐性株 (R : resistance)、上記未満の MIC 値の菌株を感受性株 (S : susceptible) と分類した (Figure. 3、4)。

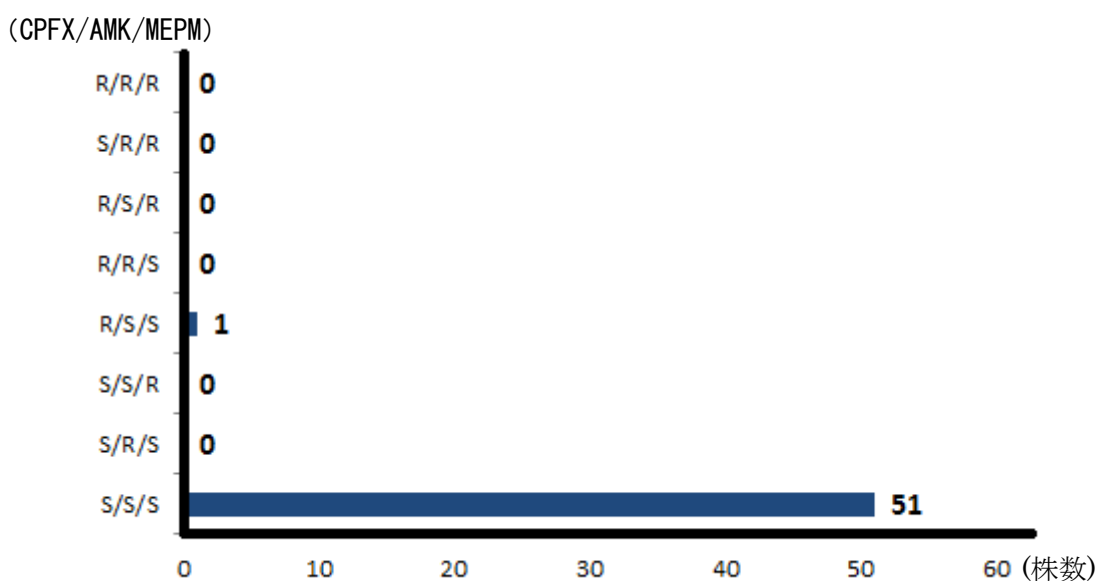


Figure. 3 外来患者由来の分離株における薬剤感受性の分布

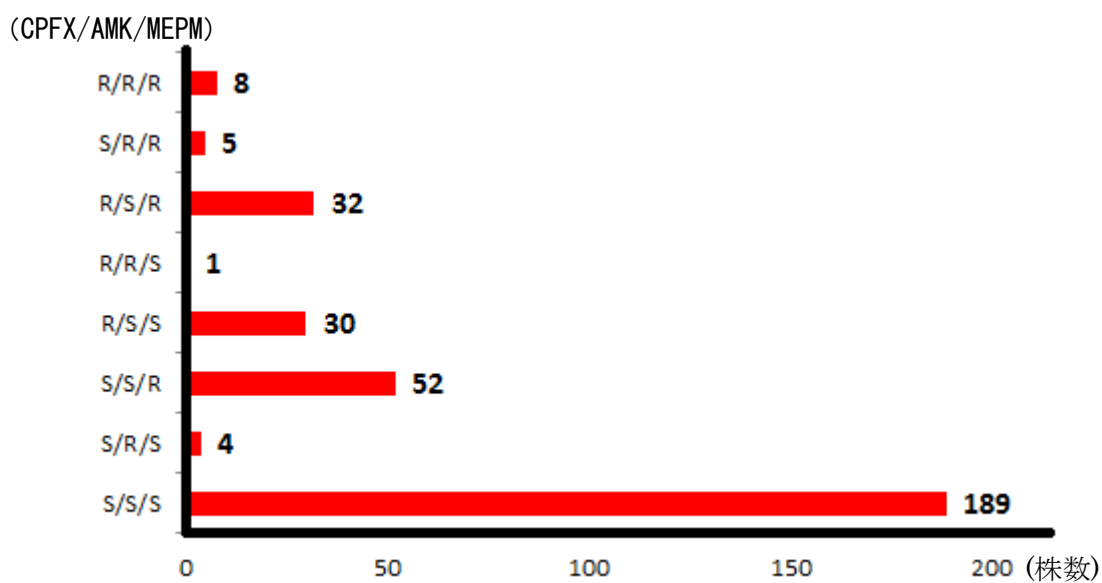


Figure. 4 入院患者由来の分離株における薬剤感受性の分布

### 3. 各抗菌薬の MIC 値の分布

本研究において測定に用いた抗菌薬5種（CPF<sub>X</sub>、PZFX、AMK、MEPM、MINO）について、入院患者由来および外来患者由来の分離株の MIC 値の分布を Figure. 5～9 に、CPF<sub>X</sub>、PZFX、AMK、MEPM の MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>90</sub> の比較を Table. 4 に示す。

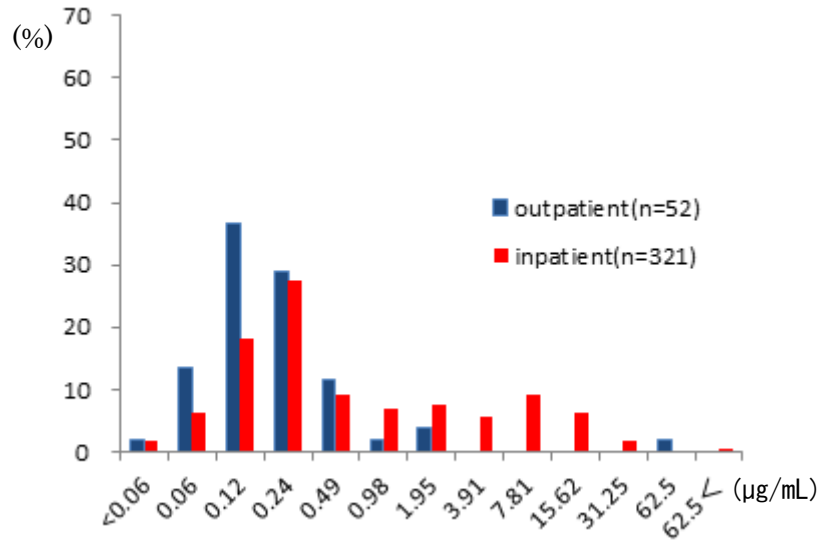


Figure. 5 CPFX の MIC 値の分布

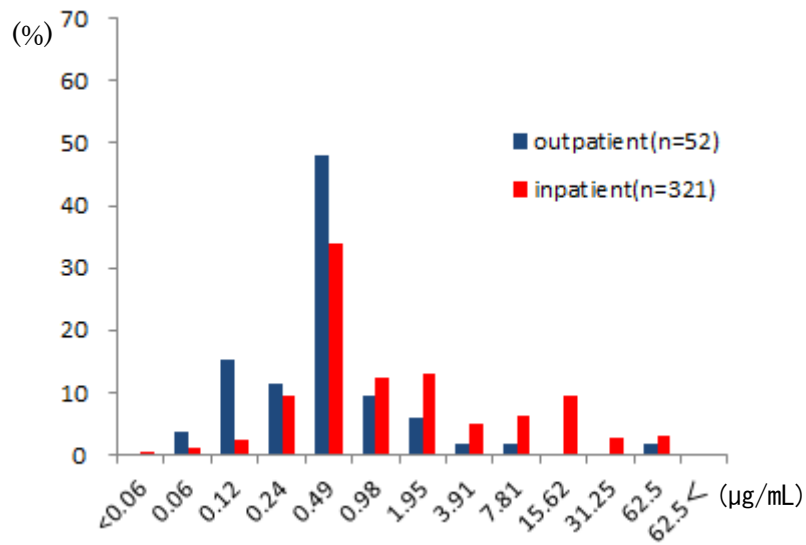


Figure. 6 PZFX の MIC 値の分布

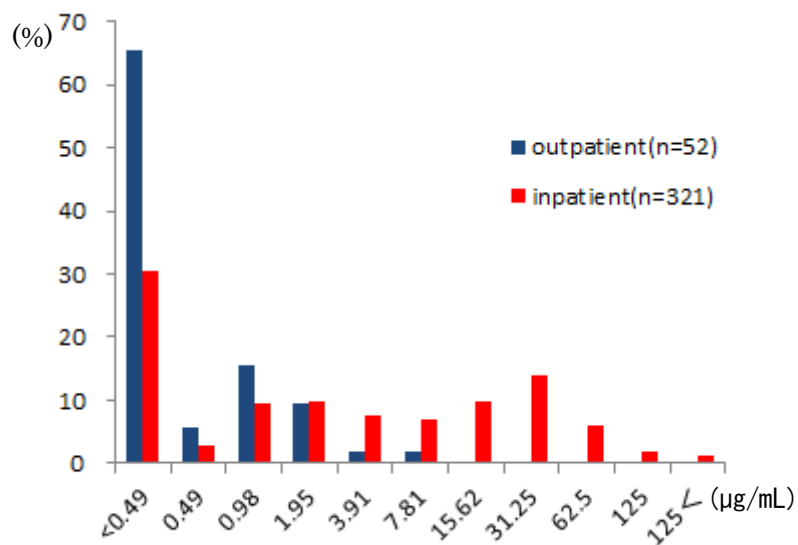


Figure. 7 MEPM の MIC 値の分布

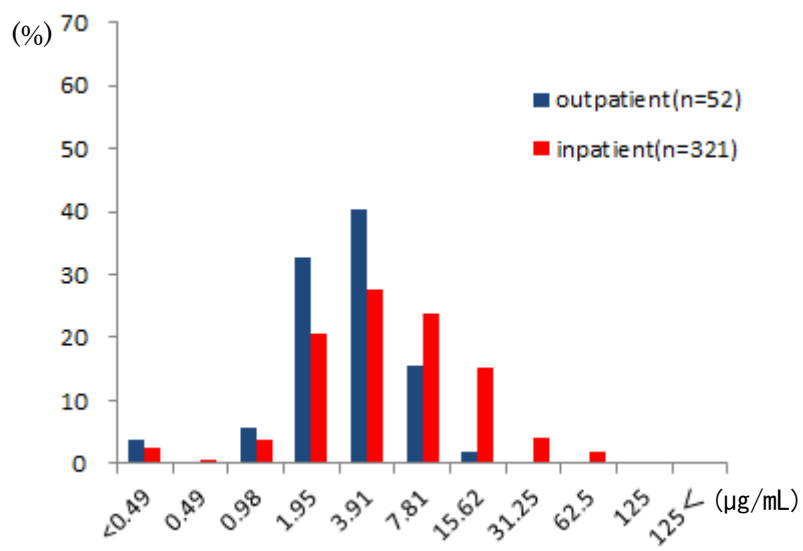


Figure. 8 AMK の MIC 値の分布

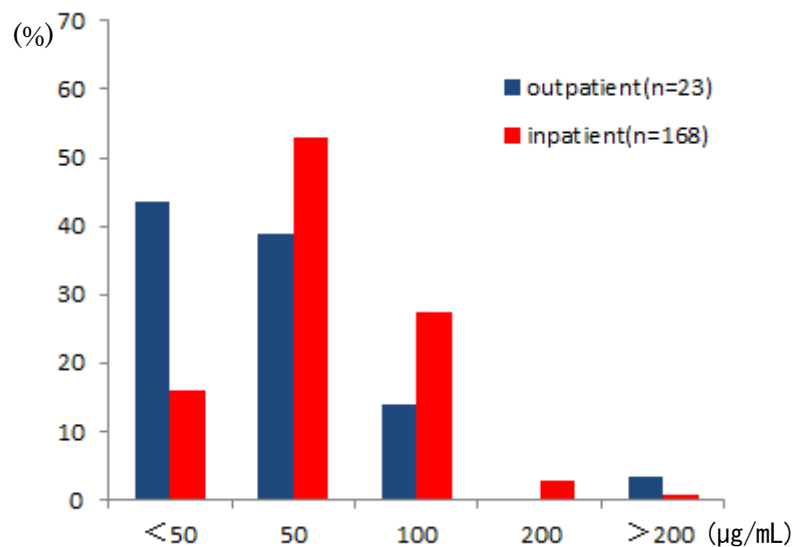


Figure. 9 MINO の MIC 値の分布

Table. 4 緑膿菌臨床分離株の MIC50 および MIC90 の比較

抗菌薬	外来 (n=52)		入院 (n=321)		全体 (n=373)	
	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90
GPFX	0.12	0.49	0.24	7.81	0.24	7.81
PZFX	0.49	0.98	0.98	15.62	0.49	15.62
AMK	3.91	7.81	3.91	15.62	3.91	15.62
MEPM	<0.49	1.95	1.95	31.25	1.95	31.25

シプロフロキサシンの MIC 値は、外来患者由来の菌株では、1 菌株を除いて、0.06 未満から 1.95µg/mL の範囲であった。それに対し入院患者由来の菌株では 0.06 未満から 62.5µg/mL 以上の範囲であった (Figure. 5)。同様に、パズフロキサシンにおいては、外来患者由来の菌株の MIC 値は 0.06~7.81µg/mL の範囲で、入院患者由来の菌株では 0.06 未満から 62.5µg/mL の範囲であった (Figure. 6)。メロペネムの MIC 値は、外来患者由来の菌株の場合 0.49 未満から 7.81µg/mL の範囲で、入院患者由来の菌株では 0.49 未満から 125µg/mL 以上の範囲であった (Figure. 7)。また、アミカシンの MIC 値は、外来患者由来の菌

株の場合 0.49 未満から 15.62 $\mu$ g/mL の範囲で、入院患者由来の菌株では 0.49 未満から 62.5 $\mu$ g/mL の範囲であった (Figure. 8)。

シプロフロキサシン耐性株の割合は、入院患者由来の菌株では 22.1%、外来患者由来の菌株では 1.9%であった。メロペネム耐性株は、入院患者由来の菌株では 30.2%、外来患者由来の菌株では全てがメロペネム感受性であった。また、アミカシン耐性の割合は、入院患者由来の菌株では 5.6%、外来患者由来の菌株ではメロペネム同様、全てが感受性株であった。(Figure. 3、4)。これらの入院患者由来株と外来患者由来株に見られた MIC 値について、Mann-Whitney の U 検定を行った結果、いずれの薬剤においても、外来患者由来の菌株より入院患者由来の菌株の方が有意差を持って MIC 値は高値に分布していることが示された。

## 第2節 考察

### 1. フルオロキノロン系抗菌薬の MIC の分布

入院患者由来と外来患者由来の分離株で比較すると、外来患者由来の分離株のほとんどがフルオロキノロン感受性株であった。例外となる 1 株の高度耐性株は、慢性中耳炎に対してタリビッド® (オフロキサシン: OFLX) 点耳薬の長期連用を受けている患者由来の株であった。一方、入院患者由来の分離株では、中等度から高度耐性の菌株の割合が、外来患者由来の菌株よりも高かった。また、CPFEX と PZFX で比較すると、PZFX の方が MIC 値は若干高かった。

### 2. 抗菌薬 3 剤に対する耐性・感受性の分布

外来患者由来の菌株はほぼ全てが薬剤感受性であるのに対し、入院患者由来の菌株では 321 株中 132 株が CPFEX、PZFX、AMK、MEPM の何れかの薬剤

に対し耐性を示した。

入院患者由来の菌株の方がより薬剤耐性菌の割合が高い理由としては、長期にわたり多種多様の抗菌薬の投与を受けることにより耐性菌が選択される、あるいは標的組織内の薬剤濃度が不十分なために、変異による中等度以上の耐性菌が出現することが考えられる。

### 3. 各抗菌薬の MIC 値の分布

本研究の結果と日本国内でのサーベイランスの結果を比較すると、2003～2004年のデータでは、日本国内の緑膿菌の CPMX および MEPM の耐性菌の割合は CPMX : 43.0%、MEPM : 12.6%<sup>(37)</sup>、2004年のデータでは CPMX : 22.2%、MEPM : 33.3%<sup>(38)</sup>、また、2007～2008年のデータでは CPMX : 28.8%、MEPM : 18.0%<sup>(39)</sup>との報告がある。今回の調査(2010年～2011年)では CPMX : 22.1%、MEPM : 30.2%であった。CPMX 耐性株は減少傾向にあり、多剤耐性菌の増加に伴い使用量の増加した MEPM に対する耐性菌は増加傾向にあると推定される。

MIC 値の分布を入院・外来で比較すると両者のピーク値にはそれほど違いは見られないが、入院患者由来では MIC 値が全体的に高値に移行していた。MIC50 と MIC90 を比較してみても、MIC50 では外来と入院で大きな差は見られないが、MIC90 では外来に比べて入院の方が明らかに高くなっていた。

このことは、入院で長期にわたって多種多様の抗菌薬を使用している場合、MIC 値が非常に高値の緑膿菌が出現することを示していると考えられる。また、MEPM の場合は MIC50 の時点で入院の方が 2 管以上高くなっていることから、本来は非常に低濃度で効果を示す抗菌薬であっても、薬剤使用量の増加に伴い耐性株の出現頻度が増大し、耐性を獲得した菌株が生存した結果と考えられる。



### 第三章 緑膿菌臨床分離株の薬剤耐性機構

#### 第一節 フルオロキノロン耐性機構

緑膿菌のフルオロキノロン系抗菌薬耐性機序の 1 つとして標的分子である II 型トポイソメラーゼの変異による薬剤親和性の低下が報告されている。II 型トポイソメラーゼは DNA 複製時に 2 本鎖 DNA の切断、再結合を行う DNA 複製に必須の酵素である。II 型トポイソメラーゼは、DNA ジャイレースとトポイソメラーゼ IV に分けられ、DNA ジャイレースは GyrA、GyrB、トポイソメラーゼ IV は ParC、ParE のサブユニットから構成される<sup>(40)</sup>。特に GyrA と ParC の変異が緑膿菌のキノロン系薬剤耐性化への関与が強く、これらの遺伝子領域の変異により薬剤作用部位に変化が起こるため、フルオロキノロン系抗菌薬が結合できなくなると考えられている。またグラム陽性、陰性に関わらず、この QRDR (Quinolone Resistance-Determining Region) のアミノ酸配列は非常に保存性が高いことが知られている (Figure. 10)<sup>(41)</sup>。

83 87

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	VIGKYHPHGD <b>S</b> AVY <b>D</b> TIVRMAQPF
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	VIGKYHPHGD <b>T</b> AVY <b>D</b> TIVRMAQPF
<i>Klebsiella pneumonia</i>	VIGKYHPHGD <b>S</b> AVY <b>D</b> TIVRMAQPF
<i>Salmonella enterica</i>	VIGKYHPHGD <b>S</b> AVY <b>D</b> TIVRMAQPF
<i>Escherichia coli</i>	VIGKYHPHGD <b>S</b> AVY <b>D</b> TIVRMAQPF
<i>Serratia marcescens</i>	VIGKYHPHGD <b>S</b> AVY <b>D</b> TIVRMAQPF
<i>Helicobacter pylori</i>	VIGKYHPHGD <b>T</b> AVY <b>D</b> ALVRMAQDF
<i>Bacillus subtilis</i>	VIGKYHPHGD <b>S</b> AVY <b>E</b> SMVRMAQDF
<i>Streptococcus pneumonia</i>	VMGKYHPHGD <b>S</b> SIY <b>E</b> AMVRMAQWW
<i>Staphylococcus aureus</i>	VMGKYHPHGD <b>S</b> SIY <b>E</b> AMVRMAQDF
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	TMGQFHPHGD <b>S</b> ATY <b>D</b> TLVRLAQDW

Figure. 10 キノロン耐性決定領域のアミノ酸配列 (Wong et al. <sup>(41)</sup>より引用)

今回、臨床分離株 373 株のうち、CPFX または PZFX の MIC 値が 3.91 $\mu$ g/mL 以上の菌株、あるいは同一患者から複数回検出された菌株、計 135 株の *gyrA*、*parC* の QRDR を含む領域の塩基配列を決定し、緑膿菌の標準株である *Pseudomonas aeruginosa* PA01 の *gyrA*、*parC* の塩基配列と比較することで、変異の有無を調べた。

## 第 1 節 結果

### 1. GyrA の変異位置と株数

Figure. 13(A)に示したPA01株の*gyrA*塩基配列を基に作成したプライマーを用いて増幅したQRDR を含む378bpのPCR断片について塩基配列の決定を行った (Figure. 13(A))<sup>(42)</sup>。

	F primer	
1	atgggcgaactggccaaagaaattctcccgtcaatatcgaagacgagctgaaacagtcc	60
1	M G E L A K E I L P V N I E D E L K Q S	20
61	tatctcgactacgcatgagcgtgatcgtcgggcgggccctgcgggatgcacgtgacggc	120
21	Y L D Y A M S V I V G R A L P D A R D G	40
121	ctgaagccggtgcaccgccgtgtgctttatgccatgagcgagctgggcaacgactggaac	180
41	L K P V H R R V L Y A M S E L G N D W N	60
181	aagccctacaagaaatccgcccggtgtggtcggcgacgtgatcggtaagtaccaccgcac	240
61	K P Y K K S A R V V G D V I G K Y H P H	80
241	ggcgacaccgcggtctacgacaccatcgtgogcatggcgacgacggttctcgctgcgctac	300
81	G D T A V Y D T I V R M A Q P F S L R Y	100
301	atgctggtagacggccagggaacttcggttcggtggacggcgacaacgccgcagccatg	360
101	M L V D G Q G N F G S V D G D N A A A M	120

361	cgatacaccgaagtgcgcatggccaagctggcccacgaactgctggcggacctggaaaag	420
121	R Y T E V R M A K L A H E L L A D L E K	140
	_____ R primer	
421	gaaaccgtcgactgggtgcccactacgatggcaccgagcagatcccggcggatcatgccg	480
141	E T V D W V P N Y D G T E Q I P A V M P	160
481	accaagattcccaacctgctggtcaacggttcagcggatcgccgtgggcatggcgacc	540
161	T K I P N L L V N G S S G I A V G M A T	180
541	aacatcccgcgcacaacctcggcgaagtgatcgacggctgcctggcgctgatggacaac	600
181	N I P P H N L G E V I D G C L A L M D N	200
601	cccgacctgaccgtcgatgagctgatgcagtacatccccggtcggacttccccaccgcc	660
201	P D L T V D E L M Q Y I P G P D F P T A	220
661	ggcatcatcaacggccgcgccgggatcatcgaggcctaccgcaccggtcgcgggcgcac	720
221	G I I N G R A G I I E A Y R T G R G R I	240
721	tacatccgtgcccgcgcgtcgtcgaggagatggagaagggcggcggtcgcgagcagatt	780
241	Y I R A R A V V E E M E K G G G R E Q I	260
781	atcatcaccgagctgccgtaccagttgaacaaggcgcggttgatcgagaagatcgccgag	840
261	I I T E L P Y Q L N K A R L I E K I A E	280
841	ctggtgaaagagaagaagatcgagggtatctccgagctgcgcgacgagtctgacaaggac	900
281	L V K E K K I E G I S E L R D E S D K D	300
901	ggcatgcgcgtggtcatcgagctgcgtcgcggcgaggtggcgaggtggtcctcaacaac	960
301	G M R V V I E L R R G E V G E V V L N N	320
961	ctctatgccagaccagctgcagagcgtgttcggcatcaacgtggtggccctggtogac	1020
321	L Y A Q T Q L Q S V F G I N V V A L V D	340
1021	ggccagccgcgcacgctgaacctgaaggacatgctcgagggtgttcgtccgccaccgccgc	1080
341	G Q P R T L N L K D M L E V F V R H R R	360

1081	gaagtgggtgacccggcgtaccgtctacgagctgcgcaaggcccgcgagcgcgggcacatc	1140
361	E V V T R R T V Y E L R K A R E R G H I	380
1141	ctggaaggccaggcggctgccctgtcgaacatcgacccggtgatcgagctgatcaagagt	1200
381	L E G Q A V A L S N I D P V I E L I K S	400
1201	tcgccgaccccgccgaggccaaggaacgcctgatcgccactgcctgggagtccagcgcg	1260
401	S P T P A E A K E R L I A T A W E S S A	420
1261	gtggaagcgatggtcgagcgtgccggcggcagcgcctgtcgtccggaagacctggatccg	1320
421	V E A M V E R A G A D A C R P E D L D P	440
1321	cagtacggcctgcgcgacggcaagtactacctgtcgccggagcaggcccaggcgatcctc	1380
441	Q Y G L R D G K Y Y L S P E Q A Q A I L	460
1381	gagctgcgccctgcatcgccctgaccggcctggagcagcagagaagctgctctccgaataccag	1440
461	E L R L H R L T G L E H E K L L S E Y Q	480
1441	gaaatcctcaacctgatcgggcgagctgatccgcacatcctgaccaaccggcgcgcctgatg	1500
481	E I L N L I G E L I R I L T N P A R L M	500
1501	gaggtgatccgtgaggaactggaagcggcgaaggccgaattcggcgatgctcgccgcacc	1560
501	E V I R E E L E A V K A E F G D A R R T	520
1561	gagatcgtggccttcccaggctgacctgaccatcgccgacctgatcaccgaggaagaccgc	1620
521	E I V A S Q V D L T I A D L I T E E D R	540
1621	gtggtgaccatctcgcacggcggctacccaagtcccagccgctggccgcctaccaggcg	1680
541	V V T I S H G G Y A K S Q P L A A Y Q A	560
1681	cagcgtcgcggcggcaaaggcaagtccgccaccgggatgaaggacgaggactacatogaa	1740
561	Q R R G G K G K S A T G M K D E D Y I E	580
1741	cacctgctggtggccaacagccatgcgaccctcctgctgttctocagcaagggaaggtc	1800
581	H L L V A N S H A T L L L F S S K G K V	600

1801	tactggctgcgtaccttcgagattccggaagcctcgcgtaccgcgctggccggccgctg	1860
601	Y W L R T F E I P E A S R T A R G R P L	620
1861	gtgaacctgctgccgctggatgagggcgagcggatcaccgcgatgttgacagatcgacctg	1920
621	V N L L P L D E G E R I T A M L Q I D L	640
1921	gaggcgctgcagcagaacgggtggcgccgatgacgacctcgacgaagccgaaggcgcggtg	1980
641	E A L Q Q N G G A D D D L D E A E G A V	660
1981	ctcgagggcgaggtggtcagggccgaggtcaggaagtcgagggcgagaccgccgag	2040
661	L E G E V V E A A E V E E V E G E T A E	680
2041	ctggtggccgagccgaccggcgcctacatcttcatggccaccgccttcggtaccgtgaag	2100
681	L V A E P T G A Y I F M A T A F G T V K	700
2101	aagaccccgcctggtgcagttcagccgtccgcgcagcagcggcctgatcgcgctcaagctg	2160
701	K T P L V Q F S R P R S S G L I A L K L	720
2161	gaagagggcgacaccctgatcgcgccgagatcaccgatggcgccaaggaagtcagctg	2220
721	E E G D T L I A A A I T D G A K E V M L	740
2221	ttctcagcgcggcaaggtgatccgcttcgccgagagcgtggtgcgcatcatggccgc	2280
741	F S S A G K V I R F A E S V V R I M G R	760
2281	aacgcccgcggcgtacgtggcatgcgcctgggcaaggggcagcagctgatctccatgctg	2340
761	N A R G V R G M R L G K G Q Q L I S M L	780
2341	attcggagtcggggcgagatcctcaccgcctccgagcgcggcttcggcaagcgtacc	2400
781	I P E S G A Q I L T A S E R G F G K R T	800
2401	ccgctgagcaagttccgcgctcgcggccgagggccaggggtgatcgccatggtcacc	2460
801	P L S K F P R R G R G G Q G V I A M V T	820
2461	aacgagcgaacggcgcgctgatcgcgcggtacaggtccaggaaggcagggagatcatg	2520
821	N E R N G A L I A A V Q V Q E G E E I M	840

```

2521 ctgatttccgaccagggcaccctggtgCGGACGCGTGTcGACGAAGTctccctgtccggc 2580
841 L I S D Q G T L V R T R V D E V S L S G 860

2581 cgcaatacccagggcgtaaccctgatcaagctCGCCAGCGACGAGGTactggTcGgtctg 2640
861 R N T Q G V T L I K L A S D E V L V G L 880

2641 gagcgtgtccaggagccgtcgggCGGAGATGACGAGGACctGCCGAGGGCGAGGAAGct 2700
881 E R V Q E P S G G D D E D L P E G E E A 900

2701 gccgaatctctgggCGAGTCGGCCGAGTCCGAGTCCGAGCCCgCGGCGGAAGCGGAAGGC 2760
901 A E S L G E S A E S E S E P A A E A E G 920

2761 aacgaagagtaa 2772
921 N E E * 924

```

Figure. 13(A) *Pseudomonas aeruginosa* PA01 gyrA の塩基配列と対応するアミノ酸配列 (Kureishi et al. <sup>(42)</sup> より引用)

A147Tの塩基置換により83番目のトレオニンがイソロイシンに変異した株が61株存在した。他にはG253Aの塩基置換によるアミノ酸配列の87番目のアスパラギン酸がアスパラギンに変異したものが7株、A254Gの塩基置換による87番目のアスパラギン酸がグリシンに変異しているものが3株存在した(Figure. 11、13(B))。

1	MGELAKEILP	VNIEDELKQS	YLDYAMSVIV	GRALPDARDG	LKPVHRRVLY	50
51	AMSELGNDWN	KPYKKSARVV	GDVIGKYHPH	GDTAVYDTIV	RMAQPFSRLY	100
				T83I (61株)		
				D87N(7株)		
				D87G(3株)		
101	MLVDGQGNFG	SVDGDNAAAM	RYTEVRMAKL	AHELLADLEK	ETVDWVPNYD	150
151	GTEQIPAVMP	TKIPNLLVNG	SSGIAVGMAT	NIPPHNLGEV	IDGCLALMDN	200
201	PDLTVDELMQ	YIPGPDFPTA	GIINGRAGHI	EAYRTGRGRI	YIRARAVVEE	250
251	MEKGGGREQI	IITELPYQLN	KARLIEKIAE	LVKEKKIEGI	SELRDESDKD	300
301	GMRVVIELRR	GEVGEVVLNN	LYAQTQLQSV	FGINVVALVD	GQPRTLNLKD	350
351	MLEVVFVRHRR	EVVTRRTVYE	LRKARERGHI	LEGQAVALSN	IDPVIELIKS	400
401	SPTPAEAKER	LIATAWESSA	VEAMVERAGA	DACRPEDLDP	QYGLRDGKYY	450
451	LSPEQAQAIL	ELRLHRLTGL	EHEKLLSEYQ	EILNLIGELI	RILTNPARLM	500
501	EVIREELEAV	KAEFGDARRT	EIVASQVDLT	IADLITEEDR	VVTISHGGYA	550
551	KSQPLAAYQA	565 QRRGG				

Figure. 11 *Pseudomonas aeruginosa* PA01 GyrA のアミノ酸配列と臨床分離緑膿菌のアミノ酸置換位置

```

81  G D T A V Y D T I V R M A Q P F S L R Y
101
241  ggcgacaccgcggtctacgacaccatcgtgcatggcgcagccgttctcgctgcgctac
301
      t          a
          g

```

Figure. 13(B) *Pseudomonas aeruginosa* PA01 *gyrA* の QRDR 塩基配列とアミノ酸配列

## 2. ParC の変異位置と株数

GyrAと同様に、Figure. 14<sup>(43)</sup>に示したPA01株の*parC*塩基配列を基に作成したプライマーを用いて増幅したQRDRを含む304bpのPCR断片について塩基配列の決定を行った (Figure. 14)。

```

1  atgagcgaatccctcgatctgagcctggaaggggtcgaacgccggtcgttggccgagttc      60
   1  M S E S L D L S L E G V E R R S L A E F      20
       _____ F primer
61  accgagcaggcctatctgaactattccatgtacgtgatcatggaccgcgccctgccgat      120
   21  T E Q A Y L N Y S M Y V I M D R A L P H      40

121 atcggcgacggcctgaaaccggtgcagcgacgcacatcgtctacgccatgagcgaactgggg      180
   41  I G D G L K P V Q R R I V Y A M S E L G      60

181 ctggatgccgattccaagcacaagaagtggcgcgccaccgtcggcgacgtgctcggcaag      240
   61  L D A D S K H K K S A R T V G D V L G K      80

241 ttccaccgcacggcgactcggcctgctacgaggccatggtgctgatggcgacgccgttc      300
   81  F H P H G D S A C Y E A M V L M A Q P F      100
       _____
301 tcctatcgctatccgctggtggacggccagggaactgggggctccggacgatccaag      360
   101 S Y R Y P L V D G Q G N W G A P D D P K      120
       _____ R primer
361 tccttcgccgccatgcgttataccgaggcgcgcctgtcgcgctattccgaggtgctgctc      420
   121 S F A A M R Y T E A R L S R Y S E V L L      140

421 agcgaactgggccagggtaccgtggactgggtaccgaacttcgacggcaccctcgacgag      480
   141 S E L G Q G T V D W V P N F D G T L D E      160

481 ccggccgtgctgccggcccgcctgcccacactgctgctcaacggcaccaccggcatgcg      540
   161 P A V L P A R L P N L L L N G T T G I A      180

541 gtgggcatggccaccgacgtgccgccgacacactgcgggaagtgcgctcggcctgcgtg      600
   181 V G M A T D V P P H N L R E V A S A C V      200

```



601	cgctgctcgaccagccgggcgcgacggtcgccgaattgtgcaacacgtgccgggcccg	660
201	R L L D Q P G A T V A E L C E H V P G P	220
661	gacttccccaccgaagccgagatcatcaccocgcgccgacctgcagaaggtctacgag	720
221	D F P T E A E I I T P R A D L Q K V Y E	240
721	accggccgcggttcggtgcgcatgcgcggtgtaccgcttcgaggacggcgatctgctc	780
241	T G R G S V R M R A V Y R F E D G D I V	260
781	atccacgccctgccgcaccaggtgtccggtccaaggtgctggaacagatgccgggcag	840
261	I H A L P H Q V S G S K V L E Q I A G Q	280
841	atgcaggccaagaagctgccgatggtggccgacctgcgcgacgagtcggaccacgagaac	900
281	M Q A K K L P M V A D L R D E S D H E N	300
901	ccgaccgcgatcgtcatcatcccgcgttcgaaccgggtcgatgtcgaagagctgatgacc	960
301	P T R I V I I P R S N R V D V E E L M T	320
961	catctgttcgccaccaccgacctggagaccagctaccgggtcaacctgaacatcatggc	1020
321	H L F A T T D L E T S Y R V N L N I I G	340
1021	ctcgacggcaagccggcagtcgaaggacctgcgccagttgctctcggagtggtgcagttc	1080
341	L D G K P A V K D L R Q L L S E W L Q F	360
1081	cgcacggcaccgtgcgtcgacgcctgcagttccgcctggacaaggtcgagcgcgcctg	1140
361	R I G T V R R R L Q F R L D K V E R R L	380
1141	catctgctggatggcttgctgatgccttcctcaacctcgacgaggtgatccacatcatc	1200
381	H L L D G L L I A F L N L D E V I H I I	400
1201	cgcaccgaggaccagcccaaggcggctgatggagcgcttcgaactcagcgaggtgcag	1260
401	R T E D Q P K A V L M E R F E L S E V Q	420
1261	gccgactacatcctcgacaccocgctgcgccagttggcacgcctggaagagatgaagatc	1320
421	A D Y I L D T R L R Q L A R L E E M K I	440

1321	cgcggcgagcaggaagagttgctgaaggagcagaagcgcctgcagaccctgctcggcagc	1380
441	R G E Q E E L L K E Q K R L Q T L L G S	460
1381	gaggccaagctgaagaagctggtgcgcgaggagctgatcaaggacgccgagacctacggc	1440
461	E A K L K K L V R E E L I K D A E T Y G	480
1441	gacgaccgccgttcgccgatcgtcgcccgccgaggcccgcgctgtcggaaaccgag	1500
481	D D R R S P I V A R A E A R A L S E T E	500
1501	ctgatgccaccgaaccggtgaccgtggtgctctcggaaaaaggctgggtgcgttgcc	1560
501	L M P T E P V T V V L S E K G W V R C A	520
1561	aaggccacgacatcgacgccgccgacctctcctacaaggccggcgacggcttcaaggcc	1620
521	K G H D I D A A G L S Y K A G D G F K A	540
1621	gccgcgccgggacgctcgaaccagtatgcggtgttcatcgactccaccgggcgagctac	1680
541	A A P G R S N Q Y A V F I D S T G R S Y	560
1681	tcgctgccggccacagcctgccgtccgcgcgaggccaggcgagccactcagcgccgg	1740
561	S L P A H S L P S A R G Q G E P L S G R	580
1741	ctgacgccgccggggggccagcttcaatgcgtgctgctgcggacgacgatgcgctg	1800
581	L T P P P G A S F E C V L L P D D D A L	600
1801	ttcgtgatcgttccgacgccggctatggttctggtcaaggcgaggacctgcaggcc	1860
601	F V I A S D A G Y G F V V K G E D L Q A	620
1861	aagaacaaggccggcaaggccctgctcagcctgcccaacggctccgccgtggtggcggc	1920
621	K N K A G K A L L S L P N G S A V V A P	640
1921	cgcccggtgcgcatgtggagcaggattggctggcgccgtgacgaccgaggccgtctg	1980
641	R P V R D V E Q D W L A A V T T E G R L	660
1981	ctattgttcaaggtctccgacctgccgagctcggcaaggcaagggaacaagatcatc	2040
661	L L F K V S D L P Q L G K G K G N K I I	680

```

2041  ggcacccccggcgaacgcgtggccagccgcgaggaatacctcaccgacctggctgttctg  2100
681  G I P G E R V A S R E E Y L T D L A V L  700

2101  ccagccggggcgacgttggtcctgcaggccggaaagcgtaccctgtcgctcaagggcgac  2160
701  P A G A T L V L Q A G K R T L S L K G D  720

2161  gacctggaacactacaagggggagcaggccggcgaggcaacaagctgccgcgcggtttc  2220
721  D L E H Y K G E R G R R G N K L P R G F  740

2221  cagcgcgtcgacagcctgctggtggatattccgccacaggattga  2265
741  Q R V D S L L V D I P P Q D *  755

```

Figure. 14 *Pseudomonas aeruginosa* PA01 *parC*の塩基配列と対応するアミノ酸配列 (Takaaki et al. <sup>(43)</sup>より引用)

C411Tの塩基置換によりアミノ酸配列の87番目のセリンがロイシンに変異しているものが12株存在した(Figure.12)。

1	MSESLDLSLE	GVERRSLAEF	TEQAYLNYSM	YVIMDRALPH	IGDGLKPVQR	50
51	RIVYAMSELG	LDADSKHKKS	ARTVGDVLGK	FHPHGDSACY	EAMVLMAQPF	100
				S87L(12株)		
101	SYRYPLVDGQ	GNWVAPDDPK	SFAAMRYTEA	RLSRYSEVLL	SELGQGTVDW	150
151	VPNFDGTLDE	PAVLPARLPN	LLLNGTTGIA	VGMATDVPPH	NLREVASACV	200
201	RLLDQPGATV	AELCEHVPGP	DFPTEAEIIT	PRADLQKVYE	TGRGSVRMRA	250
251	VYRFEDGDIV	IHALPHQVSG	SKVLEQIAGQ	MQAKKLPMVA	DLRDESDHEN	300
301	PTRIVIIPRS	NRVDVEELMT	HLFATTDLET	SYRVNLNIIG	LDGKPAVKDL	350
351	RQLLSEWLQF	RIGTVRRRLQ	FRLDKVERRL	HLDGLLIAF	LNLDEVIHII	400
401	RTEDQPKAVL	MERFELSEVQ	ADYILDTRLR	QLARLEEMKI	RGEQEELLKE	450
451	QKRLQTLGGS	EAKLKKLVRE	ELIKDAETYG	DDRRSPIVAR	AEARALSETE	500
501	LMPTEPVTVV	LSEKGVWRCA	KGHDIDAAGL	SYKAGDGFKA	AAPGRSNQYA	550
551	VFIDSTGRSY	SLPAHSLPSA	RGQGEPLSGR	LTPPPGASFE	CVLLPDDDAL	600
601	FVIASDAGYG	FVVKGEDLQA	KNKAGKALLS	LPNGSAVVAP	RPVRDVEQDW	650
651	LAAVTTEGRL	LLFKVSDLPQ	LGKKGKGNKII	GIPGERVASR	EEYLTDLAVL	700
701	PAGATLVLQA	GKRTLKSLKGD	DLEHYKGERG	RRGNKLPRGF	QRVDSLLVDI	750
751	PPQD					

Figure. 12 *Pseudomonas aeruginosa* PA01 ParC のアミノ酸配列と臨床分離緑膿菌のアミノ酸置換位置

### 3. GyrA・ParC の変異の有無と CPFY および PZFY の MIC 値の関係

キノロン標的分子である II 型トポイソメラーゼを構成する GyrA・ParC のア

ミノ酸変異の有無と、CPFX および PZFX の MIC 値の相関を調査した。

GyrA および ParC に変異のない菌株では、そのほとんどが MIC 3.91 $\mu$ g/mL 未満の感受性株であった。また、GyrA あるいは GyrA と ParC の両方が変異することによって、耐性度が高くなることが確認された。そして、GyrA、ParC のいずれにも変異がないにもかかわらず MIC 値が 15.6 $\mu$ g/mL 以上を示す高度耐性株の存在も明らかとなった (Figure. 15、16 Table. 5)。

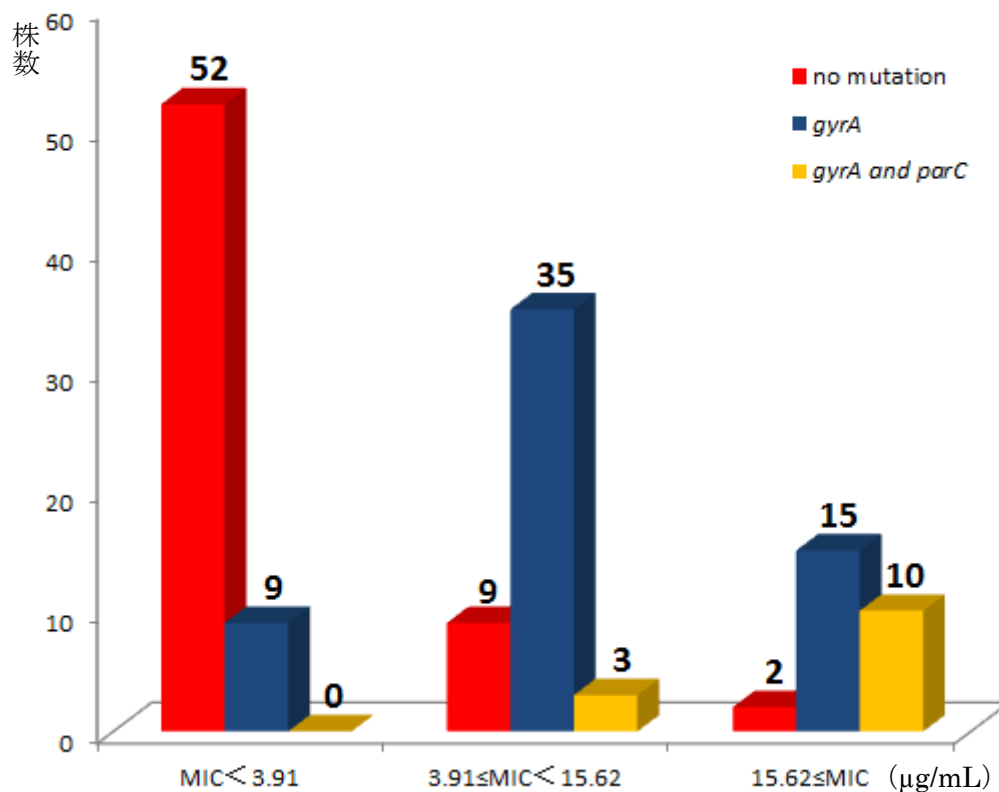


Figure. 15 GyrA・ParC の変異の有無と CPFX の MIC 値の関係

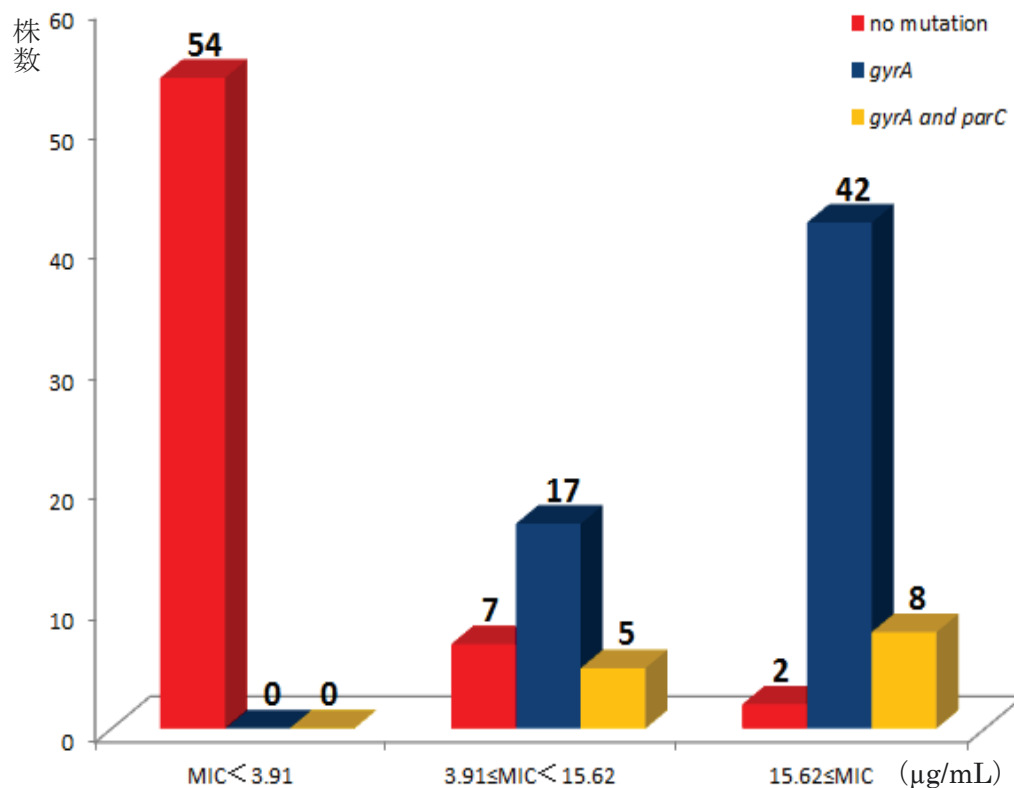


Figure. 16 GyrA・ParCの変異の有無とPZFXのMIC値の関係

Table. 5 MIC値の分布とGyrA・ParCの変異の相関

Antibiotics	No. of isolates for which MICs(μg/mL) were:											
	<0.12	0.12	0.24	0.49	0.98	1.95	3.91	7.81	15.6	31.25	62.5	>62.5
I. No substitution (n=63)												
CPFX	3	9	5	8	14	13	9		2			
PZFX		1		16	7	30	7		2			
II. GyrA [position 87] (n=6)												
CPFX					1	4	1					
PZFX							1	4	1			
III. GyrA [position 83] (n=51)												
CPFX						4	5	27	13	2		
PZFX								10	25	7	9	
IV. GyrA and ParC (n=13)												
CPFX							1	2	4	3	1	2
PZFX								5	3	3	2	
V. GyrA [position 83 and 87] and ParC (n=2)												
CPFX												2
PZFX										1	1	

## 第2節 考察

### 1. GyrAの変異位置と株数

GyrA について調べた菌株では T83I(61 株)、D87N(7 株)、D87G(3 株)の変異が認められた。アミノ酸配列の 83 番目に変異のある菌株と 87 番目に変異のある菌株について比較すると、83 番目に変異のある菌株の方が MIC 値はより高くなる結果となった。このことから、緑膿菌のフルオロキノロン高度耐性には GyrA の 83 番目の変異の関与が大きいことが示唆された。

## 2. ParC の変異位置と株数

ParC について調べた菌株では S87L(12 株)の変異のみが認められた。また、ParC 単独で変異のある菌株は一切認めなかった。

GyrA、ParC に関して、これらの変異は従来から報告されているフルオロキノロン耐性に関わる変異と同一であり<sup>(44)</sup>、今回分離された CPFIX あるいは PZFX 耐性株の耐性に寄与するものと考えられる。

## 3. GyrA・ParC の変異の有無と CPFIX および PZFX の MIC 値の関係

GyrA・ParC に変異がなければ CPFIX および PZFX の MIC 値が小さいことが多く、変異があれば MIC 値が大きくなるが多かった。GyrA・ParC の両方に変異がある菌株では、高度耐性株が多かった。変異から見れば、臨床分離株においても、フルオロキノロン系抗菌薬の標的分子である II 型トポイソメラーゼの変異による親和性の低下がフルオロキノロン系抗菌薬耐性の主な原因であると考えられる。

グラム陽性菌では、フルオロキノロン耐性の最初のターゲットがトポイソメラーゼIV(特に ParC)の変異であるのに対し、グラム陰性菌では DNA ジャイレース(特に GyrA)の変異であるとの報告がある<sup>(45,46)</sup>。グラム陽性菌である *Staphylococcus aureus* でのシプロフロキサシン耐性は、最初に *grlA (parC)* の

Ser80 が一塩基置換により Phe、Tyr に変化、あるいは Glu84 が同様に一塩基置換により Lys に変化することによりキノロン耐性を示し、第二段階では *gyrA* の Ser84 が Leu に、または GLu88 が Lys に変化することにより、更に耐性化することが報告されている<sup>(47)</sup>。今回の結果も ParC のみの変異株は存在しなかったため、緑膿菌臨床分離株においても、フルオロキノロン耐性の最初のターゲットは DNA ジャイレース(特に GyrA)であることが示された。さらに、GyrA と ParC の QRDR のアミノ酸配列は非常に相同性が高く、キノロン耐性に関与するアミノ酸置換の位置も同じであることがわかった (Figure. 17)。

VIGKYH**PHG**DSAVYDTIVR**MAQPF** GyrA

VLGKFH**PHG**DSAC**YE**AMVL**MAQPF** ParC

Figure. 17 GyrA と ParC の QRDR のアミノ酸配列

しかし、今回調査した 135 株の中には GyrA に変異があるにもかかわらず CPFXX に感受性のある例外も存在した (Table. 6)。

Table. 6 GyrA 変異株における CPFXX の MIC1.95µg/mL 以下の菌株

No.	MIC(µg/mL)				変異位置	
	CPFXX	PZFX	AMK	MEPM	GyrA	ParC
37	1.95	7.81	3.91	1.95	T83I	-
304	1.95	7.81	3.91	7.81	T83I	-
305	1.95	15.6	1.95	7.81	T83I	-
318	1.95	7.81	7.81	3.91	T83I	-
110	1.95	7.81	1.95	1.95	D87G	-
123	1.95	7.81	1.95	62.5	D87G	-
140	1.95	7.81	1.95	62.5	D87G	-
280	1.95	7.81	1.95	0.98	D87N	-
370	0.98	3.91	7.81	1.95	D87N	-



これらの菌株は CPFY には感受性であるが、PZFY には耐性の菌株である。また、5 株についてはアミノ酸配列の 87 番目の変異である。Table. 5 と合わせてみると、一般に T83I の変異がフルオロキノロン高度耐性に関与しているのに対して D87G、D87N の変異はフルオロキノロン低度耐性に関与していると考えられる。

また、GyrA・ParC に変異がないにもかかわらず CPFY の MIC 値が高い菌株の存在も明らかとなった (Table. 7)。

Table. 7 GyrA・ParC に変異のない CPFY 耐性株

No.	MIC( $\mu\text{g/mL}$ )				変異位置	
	CPFY	PZFY	AMK	MEPM	GyrA	ParC
118	3.91	1.95	15.62	31.25	-	-
136	3.91	1.95	15.62	31.25	-	-
143	3.91	1.95	15.62	31.25	-	-
144	3.91	1.95	15.62	31.25	-	-
145	3.91	1.95	31.25	31.25	-	-
148	3.91	1.95	15.62	31.25	-	-
152	3.91	1.95	15.62	31.25	-	-
156	3.91	1.95	15.62	31.25	-	-
162	3.91	1.95	15.62	31.25	-	-
286	15.62	15.62	1.95	15.62	-	-
297	15.62	15.62	3.91	15.62	-	-

これらの菌株においては、フルオロキノロン耐性の原因は標的分子である II 型トポイソメラーゼの *gyrA* および *parC* の変異による親和性の低下とは異なる原因が存在すると考えられる。本研究では、*gyrA* および *parC* の変異についてのみ検討を行ったが、大腸菌<sup>(48)</sup>、クロストリジウム・デイフィシル<sup>(49)</sup>、結核菌<sup>(50)</sup> では *gyrB* の変異によるキノロン耐性、また、サルモネラ<sup>(51)</sup> では *gyrB* の変異のみならず *parE* の変異によるキノロン耐性も報告されている。

従って、*gyrA*・*parC* に変異がないにもかかわらず CPFY の MIC 値が高い菌株

は *gyrB* あるいは *parE* の変異によるキノロン耐性の可能性、あるいは薬剤排出ポンプの機能亢進の可能性などが推定された。

## 第二節 薬剤排出ポンプの機能亢進による耐性

第一節で述べたように、GyrA、ParC に変異がないにも関わらず高い MIC 値を示す分離株が存在した。これらの分離株の耐性の原因は標的分子である II 型トポイソメラーゼの変異による薬剤親和性の低下とは異なるものと考えられる。そこで、薬剤耐性メカニズムの 1 つである薬剤排出ポンプの機能亢進に着目し、薬剤排出ポンプの機能亢進に関連する遺伝子領域について調べた。

薬剤排出ポンプの機能亢進に関わる遺伝子として *mexZ*、*mexR*、*nfxB* が報告されている (Figure.18)<sup>(52)</sup>。

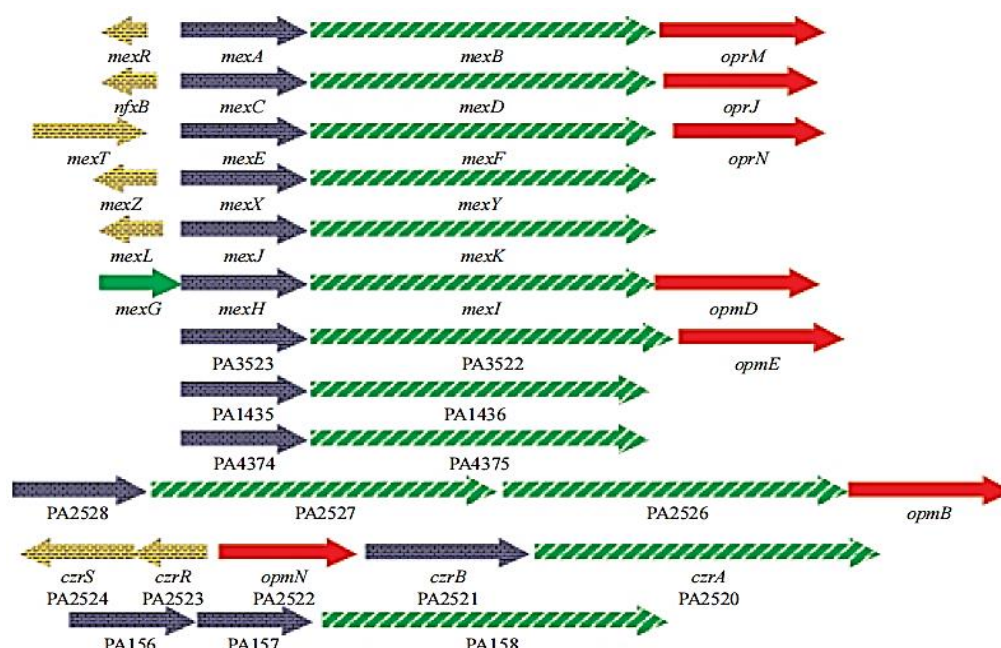


Figure. 18 薬剤排出ポンプオペロンとその制御遺伝子 (Schweizer et al.<sup>(52)</sup>より引用)

野生株では、これらの遺伝子は薬剤排出ポンプの発現を抑制しているが、変異によりレプレッサーとしての機能を喪失したタンパク質が生成することにより

排出ポンプオペロンが過剰に発現することにより抗菌薬の菌体外への汲み出しが亢進し耐性化すると考えられる。

第一節と同様の手法を用い、臨床分離株 120 株の塩基配列と緑膿菌の標準株である *Pseudomonas aeruginosa* PA01 の塩基配列を比較して変異の有無を調べた。

## 第 1 節 結果

### 1. *mexR* の変異位置と株数

PA01 株の *mexR* 塩基配列を基に作成したプライマー (Table. 8) を用いて増幅した 429bp の PCR 断片について塩基配列の決定を行った。120 株中 31 株に *mexR* に変異が認められた。特に一塩基置換による 126 番目のアミノ酸のバリンからグルタミン酸への特徴的な変異が多く存在した (Table. 9)。

Table. 8 PCR およびシーケンス用プライマー

Gene	Nucleotide sequence(5' to 3')	Nucleotide position	Accession No.
<i>gyrA</i>	<u>GTTTTCCCAGTCACGACGTTGAGTCCTATCTCGACTACGCGAT</u>	320-341	AAG06556
	AGTCGACGGTTTCCTTTTCCAG	676-697	
<i>parC</i>	<u>GTTTTCCCAGTCACGACGTTGCGAGCAGGCCTATCTGAACTAT</u>	214-235	AAG08349
	GAAGGACTTGGGATCGTCCGGA	496-517	
<i>mexZ</i>	<u>TGTAAAACGACGGCCAGTCCAGGAAAACCAAAGAGGAA</u>	5-24	AAF14521
	<u>CAGGAAACAGCTATGACCCAGCAACAGGTAGGGAGAACT</u>	601-622	
<i>mexR</i>	<u>TGTAAAACGACGGCCAGTATGAACTACCCCGTGAATCCC</u>	1-21	AAG03813
	<u>CAGGAAACAGCTATGACCGTTGCGCGGCCAGGCACTGGTCGAGGAGA</u>	399-429	
<i>nfxB</i>	<u>TGTAAAACGACGGCCAGTATGACCCTGATTTCCCATGA</u>	1-20	AAG07988
	<u>CAGGAAACAGCTATGACCAACCAGGGTGATGAACAG</u>	439-456	

Underline: 5' - end attached oligonucleotides for sequencing

; GTTTTCCCAGTCACGACGTTG, M13M4 Forward oligonucleotide,

; TGTAAAACGACGGCCAGT, M13(-21) Forward oligonucleotide,

; CAGGAAACAGCTATGAC, M13 Reverse oligonucleotide

Table. 9 MexR、MexZ、NfxB の変異位置と株数

	株数	変異位置
MexR	89	—
	29	V126E
	1	alteration from 18 to 147. Stop 31
	1	S92N. V126E
MexZ	94	—
	15	Q164 stop
	5	alteration from 115 to 210
	2	deletion 22-27
	1	alteration from 149 to 205
	1	alteration from 147 to 210
	1	A208G
	1	L17F
NfxB	118	—
	2	alteration from 35 to 184

## 2. *mexZ* の変異位置と株数

PA01 株の *mexZ* 塩基配列を基に作成したプライマー (Table. 8) を用いて増幅した 618bp の PCR 断片について塩基配列の決定を行った。*mexZ* については、120 株中 26 株に変異があり、DNA 上の 490 番目のシトシンがチミンに変異し、終止コドンになるという変異が多く存在した (Table. 9)。

## 3. *nfxB* の変異位置と株数

PA01 株の *nfxB* 塩基配列を基に作成したプライマー (Table. 8) を用いて増幅した 456bp の PCR 断片について塩基配列の決定を行った。*nfxB* では、120 株中 2 株に変異が存在した (Table. 9)。

#### 4. 薬剤排出ポンプ調節遺伝子の変異と MIC 値の相関

キノロン標的分子である II 型トポイソメラーゼを構成する GyrA や ParC の変異に加え、薬剤排出ポンプの発現の制御に関わる遺伝子として *mexZ*、*mexR*、*nfxB* の変異の有無とシプロフロキサシンおよびパズフロキサシンの MIC 値の相関を調査した。

調査対象とした臨床分離株 120 株を、遺伝子の変異の内容によって、変異の見いだされなかった I 群から、調べた全ての遺伝子に変異が見いだされた XII 群に分類した。

変異の見られなかった I 群に属する 52 株においては、その多くがキノロン感受性株であったが、シプロフロキサシンおよびパズフロキサシンの MIC 値が 3.91 $\mu$ g/mL 以上を示した菌株が、それぞれ 11 株と 8 株存在した。*mexZ* のみに変異の見られた II 群に属する菌株は、キノロン感受性であった。III 群に属する *mexZ* および *mexR* に変異の見られた菌株では、全てがシプロフロキサシン感受性であり、7 株のうち 1 株だけパズフロキサシンの MIC 値が 3.91 $\mu$ g/mL であった。IV 群と V 群に属する *gyrA* のみに変異の見られた菌株では、前述のように、一塩基置換による T83I の変異がフルオロキノロン高度耐性に関与しているのに対して D87G、D87N の変異はフルオロキノロン低度耐性に関与していると考えられる。*GyrA* の 83 位のアミノ酸置換と *mexR* に変異の見られた VI 群では、全てがキノロン耐性であった。*GyrA* の 83 位のアミノ酸置換と *mexZ* に変異の見られた VII 群に属する 14 株では、1 株を除いて全てがシプロフロキサシン耐性で、また、14 株すべてがパズフロキサシン耐性であった。VIII 群から XII 群に属する 12 株では、その全てがキノロン耐性であった (Table. 10)。

Table 10. GyrA、ParC、MexR、MexZ、NfxB の変異とシプロフロキサシンおよびパズフロキサシンの MIC 値の相関

Group, subunit	No. of isolates	Antimicrobial agents	No. of isolates for which MICs (µg/ml) were:												
			<0.12	0.12	0.24	0.49	0.98	1.95	3.91	7.81	15.6	31.25	62.5	>62.5	
I, no alteration	52	Ciprofloxacin	1	9	4	4	10	13	9		2				
		Pazufloxacin				13	5	26	6		2				
II, MexZ	1	Ciprofloxacin					1								
		Pazufloxacin							1						
III, MexZ and MexR	7	Ciprofloxacin				4	3								
		Pazufloxacin				1	2	3	1						
IV, GyrA (position 87)	6	Ciprofloxacin					1	3	2						
		Pazufloxacin								1	5				
V, GyrA (position 83)	15	Ciprofloxacin								1	14				
		Pazufloxacin									4	10	1		
VI, GyrA (83) and MexR	13	Ciprofloxacin									3	8	2		
		Pazufloxacin										2	3	8	
VII, GyrA (83) and MexZ	14	Ciprofloxacin						1			9	4			
		Pazufloxacin									2	10	2		
VIII, GyrA (83), MexZ and MexR	2	Ciprofloxacin									1	1			
		Pazufloxacin										1		1	
IX, GyrA (83), ParC and MexR	7	Ciprofloxacin									1	4	2		
		Pazufloxacin									3	2	2		
X, GyrA (83), ParC and MexZ	1	Ciprofloxacin												1	
		Pazufloxacin													1
XI, GyrA (83 and 87), ParC, MexR and NfxB	1	Ciprofloxacin													1
		Pazufloxacin											1		
XII, GyrA (83 and 87), ParC, MexZ, MexR and NfxB	1	Ciprofloxacin													1
		Pazufloxacin												1	

## 第2節 考察

薬剤排出ポンプの発現の制御に関わる遺伝子として *mexZ*、*mexR*、*nfxB* の変

異には一塩基置換によるアミノ酸の置換や終止コドンの出現、塩基欠損によるフレームシフトが存在した。これらの調節遺伝子の変異により薬剤排出ポンプの過剰発現が起こり、薬剤に対する耐性度が高まるはずであるが、キノロン標的分子であるⅡ型トポイソメラーゼを構成する *GyrA* や *ParC* に変異がなく、*mexZ* 単独あるいは *mexZ* と *mexR* に変異のあった菌株では、キノロン高度耐性の菌株は見られなかった。加えて、*nfxB* のみに変異のある菌株は認められず、*nfxB* に変異のある株では、*gyrA*、*parC*、*mexR* あるいは *mexZ* に変異のある株であった。

*GyrA* の 83 位のアミノ酸置換に加え *mexZ* あるいは *mexR* に変異が起きること、*GyrA* のみにアミノ酸置換のある株と比べて、キノロンの MIC 値は高くなる結果となった。

*GyrA* と *ParC* のアミノ酸置換と薬剤排出ポンプ調節遺伝子に変異が存在する菌株では、変異の箇所が多くなるにつれてキノロンの MIC 値は高く、高度のキノロン耐性を獲得していることが考えられた。

以上のことから、キノロン標的分子であるⅡ型トポイソメラーゼを構成する *GyrA* や *ParC* の変異に加えて、薬剤排出ポンプ調節遺伝子の変異がキノロン高度耐性に関与していることが示唆された。

### 第三節 Efflux Pump Inhibitor による MIC 値への影響

第二節において、キノロン標的分子であるⅡ型トポイソメラーゼを構成する *gyrA* や *parC* の変異に *mexZ*、*mexR*、*nfxB* などの薬剤排出ポンプ調節遺伝子の変異が加わることにより、キノロン高度耐性となることが示唆された。実際に薬剤排出ポンプ調節遺伝子の変異が薬剤排出ポンプの過剰発現に関わっているかを調べるため、Efflux Pump Inhibitor (EPI) として phenylalanine arginyl

$\beta$ -naphthylamide を用いて、EPI 添加の有無による CPFX の MIC 値の変化の検討を行った。CPFX の MIC 値に関して、EPI を加えた時の MIC 値が 1/8 以下に低下すれば CPFX への耐性に薬剤排出ポンプの過剰発現が関わっていると考えられる<sup>(53,54,55)</sup>。ここでは CPFX の MIC 値が 3.91 $\mu$ g/mL 以上の 66 株を対象とし、EPI の添加による MIC 値の変化について検討した。

## 第 1 節 結果

### 1. EPI 添加による CPFX の MIC 値の変化

CPFX の MIC 値が 3.91 $\mu$ g/mL 以上の 66 株について、DNA ジャイレース、トポイソメラーゼなどの標的蛋白 (GyrA や ParC) の変異の有無、および EPI 添加による CPFX の MIC 値の変化について検討した。

GyrA のみに変異があり、EPI の添加によっても CPFX の MIC 値の低下が 1/4 以下であった菌株は 38 株であった。また、GyrA のみに変異があり、EPI の添加によって CPFX の MIC 値が 1/8 以下に低下した菌株は 6 株であった。GyrA と ParC に変異があり、EPI の添加によっても CPFX の MIC 値の低下が 1/4 以下の菌株は 10 株であった。そして、GyrA と ParC に変異があり、EPI の添加によって CPFX の MIC 値が 1/8 以下に低下した菌株は 1 株であった。GyrA と ParC に変異がなく、EPI の添加によっても CPFX の MIC 値の低下が 1/4 以下であった菌株は 6 株であった。そして、GyrA と ParC に変異がなく、EPI の添加によって CPFX の MIC 値が 1/8 以下に低下した菌株は 5 株であった。

66 株中 EPI の添加によって CPFX の MIC 値が 1/8 以下に低下した株は 12 株であった (Table. 11)。



Table 11. シプロフロキサシンの MIC に対する EPI の影響

Strain No.	Amino acid substitutions		MIC of CPF <sub>X</sub> (μg/mL)	
	GyrA	ParC	without EPI	with EPI
368	Thr83Ile, Asp87Asn	Ser87Leu	>62.5	31.25
348	Thr83Ile, Asp87Asn	Ser87Leu	>62.5	15.6
28	Thr83Ile	Ser87Leu	62.5	15.6
12, 34, 186	Thr83Ile	Ser87Leu	31.25	7.81
63, 64	Thr83Ile	Ser87Leu	15.6	15.6
53	Thr83Ile	Ser87Leu	15.6	7.81
54	Thr83Ile	Ser87Leu	15.6	3.91
36	Thr83Ile	Ser87Leu	7.81	7.81
109, 225	Thr83Ile	-	31.25	3.91
280	Thr83Ile	-	15.6	7.81
44, 49, 121, 125, 147, 167, 168, 197, 228	Thr83Ile	-	15.6	3.91
190, 291, 292	Thr83Ile	-	15.6	1.95
74	Thr83Ile	-	7.81	7.81
35, 41, 57, 78, 116, 154, 176, 214, 235, 250, 254, 255, 258, 328	Thr83Ile	-	7.81	3.91
122, 187, 232, 238, 251, 263, 268, 270, 272, 275, 276	Thr83Ile	-	7.81	1.95
199	Thr83Ile	-	7.81	<0.49
353, 357	Asp87Asn	-	3.91	0.98
286	-	-	15.6	1.95
297	-	-	15.6	0.98
162	-	-	3.91	1.95
118, 136, 143, 144, 145	-	-	3.91	0.98
148, 152, 156	-	-	3.91	0.49

## 2. EPI の MIC に対する影響と薬剤排出ポンプ調節遺伝子の変異の関係

EPI の添加によって CPF<sub>X</sub> の MIC 値が 1/8 以下に低下した 12 株のうち 7 株には、薬剤排出ポンプ調節遺伝子の変異がみられた。残り 5 株には、調べた MexR、MexZ、NfxB に変異は認められなかった (Table. 12)。

Table. 12 EPI 添加により MIC が 3 管以上変化した株における変異位置

Strain No.	MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			変異位置					
	CPF	With EPI	変化率	PZFX	GyrA	ParC	MexZ	MexR	NfxB
148	3.91	0.49	3	1.95	—	—	—	—	—
152	3.91	0.49	3	1.95	—	—	—	—	—
156	3.91	0.49	3	1.95	—	—	—	—	—
286	15.6	1.95	3	15.6	—	—	—	—	—
297	15.6	0.98	4	15.6	—	—	—	—	—
199	7.81	<0.49	4	15.6	T83I	—	Q164stop	—	—
291	15.6	1.95	3	15.6	T83I	—	Q164stop	—	—
292	15.6	1.95	3	15.6	T83I	—	Q164stop	—	—
109	31.25	3.91	3	62.5	T83I	—	—	alteration from 18 to 147, stop31	—
190	15.6	1.95	3	62.5	T83I	—	—	V126E	—
225	31.25	3.91	3	62.5	T83I	—	—	V126E	—
348	>62.5	15.6	3	62.5	T83I, D87N	S87L	alteration from 147 to 210	V126E	alteration from 35 to 184

### 3. EPI による CPF 値の変化と薬剤排出ポンプ調節遺伝子変異の相関

EPI の添加による CPF の MIC 値の変化と薬剤排出ポンプ調節遺伝子の変異の関係を調査した。

薬剤排出ポンプ調節遺伝子 *mexR*、*mexZ* あるいは *nfxB* に変異が認められなかった 30 株中 25 株では CPF の MIC 値の低下が 1/4 以下であった。しかしながら、*mexR*、*mexZ* あるいは *nfxB* に変異が認められなかった 5/30 株では EPI の添加により MIC 値が 1/8 以下に低下した。

*mexR* に変異のみられた 19 株のうち、16 株では MIC 値の低下が 1/4 以下であったが、3 株では EPI の添加により MIC 値が 1/8 以下に低下した。

*mexZ*に変異のみられた 13 株では、10 株で EPI の添加によっても MIC 値の低下が 1/4 以下であったが、3 株では EPI の添加により MIC 値が 1/8 以下に低下した。

*mexR*と *mexZ*に変異が確認された 2 株では、EPI の添加による CPF<sub>X</sub> の MIC 値の低下は 1/4 であった。

*mexR*と *nfxB*に変異が確認された 1 株も同様に、EPI の添加によっても CPF<sub>X</sub> の MIC 値の低下は 1/4 以下であった。

*mexR*, *mexZ*および *nfxB*の全てに変異のあった 1 株では、EPI の添加により CPF<sub>X</sub> の MIC 値は 1/8 以下に低下した (Table. 13)。

Table. 13 EPI 添加による CPF<sub>X</sub> の MIC 値変化と薬剤排出ポンプ調節遺伝子変異の相関

変異位置	株数	MIC 値の変化 (管)				
		0	1	2	3	4
none	30		6	19	4	1
MexR	19	4	3	9	3	
MexZ	13		7	3	2	1
MexR+MexZ	2		1	1		
MexR+NfxB	1			1		
MexR+MexZ+NfxB	1				1	

## 第 2 節 考察

### 1. EPI 添加による CPF<sub>X</sub> の MIC 値の変化

EPI の添加により、CPF<sub>X</sub> の MIC 値が 1/8 以下に低下する菌株の存在が確認されたことから、緑膿菌のフルオロキノロン系抗菌薬に対する耐性メカニズムとして、従来から言われている DNA ジャイレースやトポイソメラーゼといった薬剤作用部位の変異だけでなく、薬剤排出ポンプの機能亢進が主な薬剤耐性機

構である菌株の存在が示唆された。

EPI の添加により CPFX の MIC 値が 1/8 以下に低下した 12 株のうち、MIC 値が 3.91 $\mu$ g/mL 未満となった 9 株においては、薬剤排出ポンプの機能亢進が薬剤耐性機構に強く関与していることが考えられ、中でも、GyrA や ParC に変異がなく、かつ CPFX の MIC 値が 3.91 $\mu$ g/mL 以上のキノロン耐性株において、EPI の添加により MIC 値が 1/8 以下に低下した 5 株については、薬剤排出ポンプの機能亢進が主な薬剤耐性機構であると考えられた。

## 2. EPI の MIC に対する影響と薬剤排出ポンプ調節遺伝子の変異の関係

CPFX の MIC 値が EPI の添加により 1/8 以下に低下した菌株を対象に、調査した 12 株のうち 7 株においては、薬剤排出ポンプ調節遺伝子の変異がみられたが、残り 5 株には、調査した領域における変異は認められなかった。Figure. 18 に示すように、薬剤排出ポンプ調節遺伝子には多様性があるため、今回調査した遺伝子以外の変異の可能性が考えられる。

また、No. 109、225、348 の 3 株については、もともとの CPFX の MIC 値が 31.25 $\mu$ g/mL 以上を示す高度耐性株であるが、EPI 添加後も CPFX に対する耐性が残存している。これは薬剤作用部位 (GyrA、ParC) の変異が主の耐性機構であると思われ、更に薬剤排出ポンプの機能亢進が重なったことによって CPFX 高度耐性になったものとする。

## 3. EPI による CPFX の MIC 値変化と薬剤排出ポンプ調節遺伝子変異の相関

EPI 添加によって CPFX の MIC 値が 1/8 以下に低下した菌株には、今回調べた 3 種の薬剤排出ポンプ調節遺伝子に変異がある菌株とない菌株の両方が存在した。また、薬剤排出ポンプ調節遺伝子に変異がある菌株では EPI 添加によっ

て CPF<sub>X</sub> の MIC 値が 1/8 以下に低下した菌株と変化しなかった菌株が存在したため、両者に明確な相関性は見られなかった。今回調べた領域以外での変異、あるいは他の排出系が関与していると考えられる。

*mexZ* および *mexR* における変異と EPI 添加による CPF<sub>X</sub> の MIC 値の変化の程度には大きな差は確認されなかった。また、*mexZ* と *mexR* の両方に変異のある菌株でさえ、EPI 添加による MIC 値の低下は 1/4 以下であった。*nfxB* に単独で変異ある菌株は存在せず、*nfxB* に変異のある菌株では、*gyrA*、*parC*、*mexZ*、*mexR*、*nfxB* の全てに変異を認め、キノロンに対し高度耐性の株であった。

これら薬剤排出ポンプ調節遺伝子の変異による調節タンパク質の不活化と薬剤排出ポンプの過剰発現の関係は逆転写酵素を用いた mRNA の発現量を調べることで明確になると考えられる。

## 第四章 緑膿菌臨床分離株の薬剤耐性の進化

2010年9月から2011年9月までに東邦大学医療センター大橋病院細菌検査室に提出された検体から分離された緑膿菌373株の中には同一患者から検出された菌株も数多く存在した。同一患者由来の緑膿菌臨床分離株を経時的に観察していると、分離初期には感受性株であった菌株が、ある時点から耐性株になるという変化が見られた。これは、突然変異しやすい株とそうではない株の存在を示唆するものと考え、突然変異しやすい菌株 (hypermutable strain) を選別することを試みた。

さらに、同一患者から分離された緑膿菌の抗菌薬に対する感受性の経時的変化を検証し、この薬剤感受性の変化が、もともと患者から検出されていた菌株の遺伝子が変わり耐性を獲得したことによるものなのか、あるいは薬剤耐性の別の菌株が伝播してきたことによるものなのかを、Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) PCR法を用いて鑑別した<sup>(56, 57)</sup>。

### 第1節 結果

#### 1. Hypermutability の確認

Hypermutability の確認には以下の式によって求めた変異頻度により評価した<sup>(58)</sup>。

$$\text{mutation frequency} = \frac{\text{LA+Rifampicinに菌液(原液)を塗布して出現したコロニー数}}{\text{LAに菌液(10}^6\text{倍希釈)を塗布して現れたコロニー数} \times 10^6}$$

Mutation frequency が  $1 \times 10^{-7}$  より大きい値であれば Hypermutable な菌である可能性が高いと評価した。

同一患者由来の分離日時の異なる緑膿菌臨床分離株のうち、細菌検査室への検体提出日が早い菌株を中心に、突然変異によるリファンピシンに対する耐性株の出現頻度を調べたところ、17株中4株が Hypermutable な菌株である可能性が高いという結果が得られた (Table. 14)。

Table. 14 Hypermutable strain の確認

patient	strain No.	mutation frequency
A	12	$2.50 \times 10^{-8}$
	19	$2.35 \times 10^{-8}$
B	49	$3.86 \times 10^{-7}$
C	86	$6.23 \times 10^{-9}$
	102	$2.89 \times 10^{-8}$
D	147	$4.83 \times 10^{-9}$
	225	$4.35 \times 10^{-7}$
	198	$3.83 \times 10^{-7}$
E	200	$3.00 \times 10^{-9}$
	270	$2.48 \times 10^{-8}$
	275	$3.52 \times 10^{-8}$
F	210	$1.06 \times 10^{-8}$
	286	$6.06 \times 10^{-8}$
	297	$2.43 \times 10^{-7}$
G	320	$2.80 \times 10^{-9}$
H	348	$9.68 \times 10^{-9}$
	368	$3.79 \times 10^{-8}$

## 2. 同一患者由来の緑膿菌の経時的データおよび ERIC PCR (1)

同一患者由来の緑膿菌臨床分離株を細菌検査室の受付日順に示した (Table. 15)。

Table. 15 同一患者由来の緑膿菌分離株の経時的变化 (1)

strain No.	使用抗菌薬	材料名	受付日	mutation frequency	MIC( $\mu$ g/mL)							変異位置			
					CPFX	with EPI	PZFX	AMK	MEPM	MINO	GyrA	ParC	MexZ	MexR	NfxB
12		吸引痰	9/13	$2.50 \times 10^{-8}$	31.25	7.81	31.25	31.25	125	<50	T83I	S87L	-	V126E	-
19	IPM/CS(3/10~3/12)	吸引痰	9/16	$2.35 \times 10^{-8}$	0.12		0.49	0.98	<0.49	<50	-	-	-	-	-
20	VCM(3/12~3/17)	吸引痰	9/16		0.06		0.49	0.98	<0.49	<50	-	-	-	-	-
34	CPFX(3/12~3/24)	吸引痰	9/16		31.25	7.81	15.6	31.25	125	50	T83I	S87L	-	V126E	-
35	CEZ(5/4~5/10) CEZ(7/20~7/23)	吸引痰	9/24		7.81	3.91	15.6	7.81	7.81	50	T83I	-	alteration from 149 to 205	V126E	-
36	IPM/CS(7/26~8/2)	カテ尿	9/24		7.81	7.81	31.25	15.62	125	50	T83I	S87L	-	V126E	-
41	IPM/CS(8/16~8/20)	吸引痰	9/27		7.81	3.91	15.6	7.81	7.81	50	T83I	-	-	-	-
53	IPM/CS(9/23~9/25)	動脈血	10/2		15.6	7.81	7.81	15.62	125	<50	T83I	S87L	-	V126E	-
54		動脈血	10/2		15.6	3.91	7.81	31.25	125	<50	T83I	S87L	-	V126E	-

IPM/CS : イミペネム/シラスタチン VCM : バンコマイシン CPFX : シプロフロキサシン CEZ : セファゾリン

最初に検出された菌株 (No. 12) の受付日の 6 か月前に CPFX の投与歴があり、この菌株はすでに CPFX 高度耐性となっていた。No. 19・20 以外の菌株は全て CPFX 高度耐性株であり、GyrA の QRDR 領域にアミノ酸置換が確認された。No. 12 と 34 と 36 および No. 53 と 54 は、各種抗菌薬の MIC 値と変異位置から、それぞれ非常に似た菌株であることが推測された。また、GyrA だけでなく、ParC、MexZ、MexR に変異を持つ菌株も確認され、これらの菌株は CPFX・AMK・MEPM の 3 剤に耐性を示すことから、“多剤耐性緑膿菌”である。

ERIC PCR を用いて同一患者由来の緑膿菌の鑑別を行った結果を以下に示す。赤字が CPFX 耐性株、黄色字が CPFX 感受性株を示す。

前述のごとく、No. 12 と 34 と 36、No. 19 と 20、No. 53 と 54 はそれぞれ非常に類似した泳動パターンを示すことが確認された (Figure. 19)。



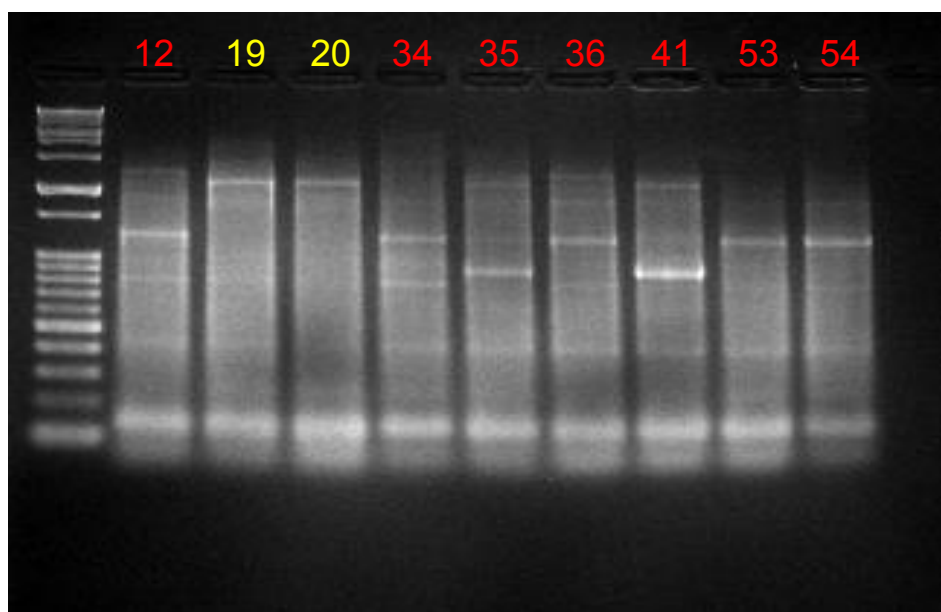


Figure. 19 同一患者由来の緑膿菌の ERIC PCR(1)

### 3. 同一患者由来の緑膿菌の経時的データおよび ERIC PCR (2)

No. 198 からの同一患者由来の緑膿菌臨床分離株に対しても、同様の手法を用いて検討を行った。

この患者から最初に検出された菌株 (No. 198) は CPFY に感受性を示すだけでなく、今回調査した全ての抗菌薬に感受性を示し、さらに、変異も認められなかった。3/29~4/8 に CPFY が投与されており、CPFY 投与開始後の 4/4 に検出された菌株 (No. 209) は CPFY の MIC 値が 8 倍に上昇していた。そして、4/25 に検出された菌株 (No. 232) 以降、No. 239・274・277 以外の菌株は全て CPFY 耐性株であり、GyrA の 83 番目のトレオニンからイソロイシンへの変異が起きていた。

No. 209 と 218 および No. 232 と 238 と 275 および No. 250 と 254 と 258 は、各種抗菌薬の MIC 値と変異位置から、それぞれ非常に似た菌株であると推定した (Table. 16)。

Table. 16 同一患者由来の緑膿菌分離株の経時的变化 (2)

strain No.	使用抗菌薬	材料名	受付日	mutation frequency	MIC( $\mu$ g/mL)							変異位置				
					CPFX	with EPI	PZFX	AMK	MEPM	MINO	GyrA	ParC	MexZ	MezR	NfxB	
198		吸引痰	3/17	$3.83 \times 10^{-7}$	0.24		0.49	1.95	0.98	50	-	-	-	-	-	
200		吸引痰	3/25	$3.00 \times 10^{-9}$	0.49		0.98	7.81	15.6	100	-	-	alteration from 115 to 210		V126E	-
203		吸引痰	3/28		0.12		0.49	7.81	3.91	50	-	-	-	-	-	
209		吸引痰	4/4		1.95	0.49	3.91	3.91	3.91	100	-	-	-	-	-	
218		吸引痰	4/11		1.95	0.49	3.91	1.95	3.91	100	-	-	-	-	-	
223		吸引痰	4/18		1.95	0.49	1.95	0.98	15.6	200	-	-	-	-	-	
231		吸引痰	4/25		0.24		0.49	7.81	31.25	50	-	-	-	-	-	
232	CEZ(3/14~3/19)	吸引痰	4/25		7.81	1.95	15.6	15.62	3.91	50	T83I	-	-	-	-	
238	IPM/CS(3/20~3/29)	吸引痰	5/2		7.81	1.95	15.6	15.62	3.91	50	T83I	-	-	-	-	
239	CPFX(3/29~4/8)	吸引痰	5/2		0.24		0.49	7.81	<0.49	50	-	-	-	-	-	
250	CAZ(4/9~4/14)	吸引痰	5/9		7.81	3.91	15.6	3.91	3.91	50	T83I	-	-	-	-	
251	CAZ(5/9~5/20)	吸引痰	5/9		7.81	1.95	15.6	3.91	3.91	50	T83I	-	-	-	-	
254	VCM(5/11~5/20)	吸引痰	5/12		7.81	3.91	15.6	15.62	31.25	50	T83I	-	-	-	-	
255	AMK(5/23~5/25)	吸引痰	5/12		7.81	3.91	7.81	15.62	31.25	50	T83I	-	-	-	-	
258		吸引痰	5/16		7.81	3.91	15.6	7.81	31.25	50	T83I	-	-	-	-	
268		吸引痰	5/19		7.81	1.95	7.81	7.81	31.25	50	T83I	-	-	-	-	
270		吸引痰	5/20	$2.48 \times 10^{-8}$	7.81	1.95	7.81	15.62	31.25	50	T83I	-	-	-	-	
272		吸引痰	5/23		7.81	1.95	31.25	7.81	31.25	50	T83I	-	-	-	-	
274		吸引痰	5/23		0.24		0.49	3.91	1.95	50	-	-	-	-	-	
275		吸引痰	5/23	$3.52 \times 10^{-8}$	7.81	1.95	15.6	7.81	31.25	50	T83I	-	-	-	-	
276		吸引痰	5/23		7.81	1.95	7.81	7.81	31.25	50	T83I	-	-	-	-	
277		吸引痰	5/23		0.12		0.49	7.81	1.95	50	-	-	-	-	-	

CEZ : セファゾリン IPM/CS : イミペネム/シラスタチン CPFX : シプロフロキサシン CAZ : セフトジジム  
VCM : バンコマイシン AMK : アミカシン

ERIC PCR を用いて同一患者由来の緑膿菌の鑑別を行った結果を以下に示す。  
赤字が CPFX 耐性株、黄色字が CPFX 感受性株を示す。

No. 198、200、254、255、268 はそれぞれ異なる特徴の泳動パターンを示すことが確認された。また、No. 203・277、No. 209・231・239、No. 218・223・

274、No. 232・238、No. 250・251・258・270・272・275・276 の泳動パターンはそれぞれ類似していることが確認された (Figure. 20)。

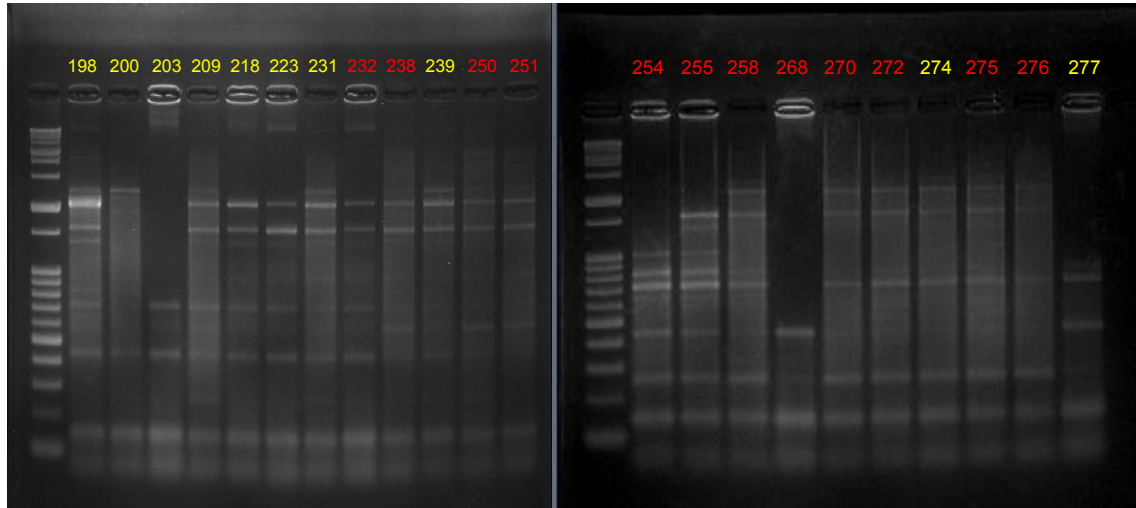


Figure. 20 同一患者由来の緑膿菌の ERIC PCR(2)

## 第2節 考察

### 1. hypermutability について

Mutation frequency (変異頻度)  $1 \times 10^{-7}$  を基準とし、それよりも大きな値を示す hypermutable strain が臨床分離株の中に存在することが確認された。このような hypermutable strain を保持する患者に対して様々な抗菌薬を長期連用する間に、突然変異により薬剤耐性を獲得した変異株が選択され、その結果として種々の薬剤に耐性を獲得した菌株が選択されたものと考えられる。

### 2. 同一患者由来の緑膿菌の経時的データおよび ERIC PCR (1)

Table. 15、Figure. 19 に示す同一患者由来の菌株は、3/12~3/24 に CPFY が投与されており、GyrA に T83I のアミノ酸置換を生じたことにより CPFY 耐性株となったと考える。さらに、GyrA のみならず、ParC や MexZ、MexR にも

変異が起きた菌株もあり、このことが CPFX 高度耐性株の出現の原因になったと考えられる。

ERIC PCR の泳動パターンから、No. 12 と 19 を比較すると、異なる泳動パターンであることから、由来の異なる菌株であると考えられる。No. 19 と 20 では、泳動パターンが同一であり、各種抗菌薬の MIC 値の結果と併せて評価すると、非常に類似した結果であることから、これらの菌株は同じ由来の菌株である可能性が非常に高いと考えられる。

MIC 値や変異の有無、ERIC PCR の泳動パターンを総合的に評価することで、No. 12・34・36、No. 19・20、No. 35・41、No. 53・54 はそれぞれ由来を同じくする菌株であると考えられる。

### 3. 同一患者由来の緑膿菌の経時的データおよび ERIC PCR (2)

Table. 16 の CPFX の MIC 値を見ると、検体受付日の早い時期の菌株は CPFX 感受性株であるのに対し、受付日の後半の菌株は CPFX 耐性株が多くなっていた。この MIC 値の変化の原因としては、CPFX が 3/29~4/8 に投与されており、この後から CPFX の MIC 値の上昇がみられ、さらに GyrA の T83I のアミノ酸置換が起きたことによると考えられる。

MIC 値や変異の有無および ERIC PCR の結果と併せて鑑別することにより、No. 231 と 239、No. 218・223・274、No. 232 と 238、No. 250 と 251、No. 258・270・272・275・276 はそれぞれ由来を同一とした菌株である可能性が高いと考えられる。

No. 198 は変異頻度が  $3.83 \times 10^{-7}$  と高値を示していることから、hypermutable strain であり、今回調べた全ての抗菌薬に対して感受性であったが、シプロフロキサシンの投与がなされて以降の菌株においては、ほとんどが

フルオロキノロン耐性となっている。このような hypermutable strain を保持する患者に対して様々な抗菌薬を、不十分な標的組織内濃度で長期連用することにより hypermutable strain 由来の薬剤耐性株が出現し、抗菌療法をより困難なものにすると考えられる。

CPFX に感受性でありつつも hypermutable な菌株に遺伝子の変異が起きて CPFX 耐性株になった場合、ERIC PCR の泳動パターンにどのような変化が起きるかは確認できていない。また、CPFX の投与期間が長期に及ばなくとも GyrA に変異が起き、CPFX 耐性株となる可能性が示唆された。一度 GyrA に変異が起きると、たとえキノロンの投与を避けたとしても、感受性株に戻ることは期待できず、感染対策上大きな問題となることが示された。

## 第五章 総括

高齢化が進む日本の社会現象は、医療機関を受診、あるいは入院している患者においても例外ではない。その中で、医療の高度化は我々に多くの恩恵をもたらした。しかしその反面、高度な医療の提供は、感染に対して抵抗力の低下した高齢者に対しても行われ、その結果として、広く環境中に分布しているだけでなく、健常者の体表にも常在している緑膿菌によって重篤な感染症を引き起こすという新たな問題の要因となっていることも事実である。

緑膿菌感染症に対し、様々な強力かつ広範囲の抗菌スペクトラムを有する抗菌薬が投入され、そのたびに耐性菌出現という問題に直面してきた。今までに、緑膿菌の薬剤耐性機構に関する調査研究が行われ、薬剤作用部位の変異や薬剤排出ポンプの機能亢進、外膜のポリンの減数、バイオフィルムの形成、薬剤修飾酵素の産生などが報告されてきた。しかし、臨床分離株における薬剤耐性機構の詳細は不明であり、同一患者から検出された菌株に対し、投与薬剤と投与期間、各種抗菌薬の MIC 値の推移、薬剤作用部位の変異や排出ポンプの機能亢進の有無などを体系的に調査した研究はない。本研究では、多数の緑膿菌臨床分離株を対象とした各種抗菌薬に対する耐性と遺伝子の変異の相関および、同一患者由来の緑膿菌の薬剤耐性の経時変化についていくつかの知見を得ることができた。

第二章では、臨床分離株の各種抗菌薬に対する MIC 値の比較を行った。外来患者由来の菌株と入院患者由来の菌株では、各種抗菌薬の MIC 値は入院患者由来の菌株の方が高いことが明らかとなった。このことは、広域スペクトラムを有する抗菌薬の長期連用の功罪の一端であるといえる。また、外来患者由来の菌株では、慢性中耳炎に対しオフロキサシン点耳薬の長期間連用を続けていた

1例を除いて、ほぼ全ての株がフルオロキノロン感受性株であったのに対し、入院患者由来の菌株では20%以上が耐性株であった。同様にアミカシン (AMK) とメロペネム (MEPM) では、外来患者由来の菌株は100%感受性であったが、入院患者由来の菌株では5.6%がAMK耐性で、30.2%がMEPM耐性であった。過去の全国多施設共同研究のサーベイランスデータと比較すると、2004年ではCPFX耐性緑膿菌の割合は22.2%、MEPM耐性緑膿菌の割合は33.3%、2007～2008年ではCPFX耐性緑膿菌の割合は28.8%、MEPM耐性緑膿菌の割合は18.0%であった。本研究の入院患者由来の緑膿菌では、CPFX耐性の割合は22.1%、MEPM耐性の割合は30.2%ということから、CPFX耐性菌の割合は若干ながら減少傾向にあり、MEPM耐性菌の割合は増加傾向にあると推定される。これを言い換えると、本来緑膿菌感染症に対して有効な治療薬として汎用されてきたキノロンやカルバペネム系抗菌薬が効かないことを意味しており、医療施設内での緑膿菌感染症治療において非常に大きな問題となると考えられる。

第三章では、フルオロキノロン系抗菌薬の標的分子であるII型トポイソメラーゼを構成するGyrA、ParCの変異とフルオロキノロン系抗菌薬に対する耐性に、相関を確認することができた。緑膿菌臨床分離株において、フルオロキノロン系抗菌薬の標的タンパク質であるGyrAとParCの変異に関しては、ParCのみに変異のある菌株は本研究で調べた限りでは確認されなかった。従って、本研究で対象とした緑膿菌のトポイソメラーゼIIの変異によるフルオロキノロン耐性は、まずGyrAに変異が起こり、次いでParCに変異が起こることが確認された。さらに、フルオロキノロン系抗菌薬に対する耐性度は、GyrAの変異、さらにGyrAに加えてParCの変異というように、標的タンパク質の変異が重なることによって高度耐性になることが確認された。ただし、GyrA、ParCのいずれにも変異がないにもかかわらずMIC値が15.6 $\mu$ g/mL以上を示す高度耐性

株の存在も明らかとなった。GyrA に関しては T83I、D87N、D87G の変異が確認され、83 番目に変異のある菌株の方が MIC 値はより高く、キノロンの高度耐性に関与していることが示唆された。同様に 87 番目の変異はキノロンの低度耐性に関与していることが示唆された。また、ParC に関しては S87L の変異のみが認められた。GyrA、ParC に関して、これらの変異は従来から報告されているフルオロキノロン耐性に関わる変異と同一であり、臨床分離株における CPFX および PZFX 耐性に寄与するものと思われる。

GyrA、ParC のいずれにも変異がないにもかかわらずフルオロキノロン系抗菌薬に高度耐性を示す菌株については、本研究では II 型トポイソメラーゼの GyrA と ParC の変異の有無についてのみ検討を行ったが、大腸菌やクロストリジウム・ディフィシル、結核菌では *gyrB* の変異によるキノロン耐性、また、サルモネラでは *gyrB* の変異のみならず *parE* の変異によるキノロン耐性も報告されていることから、今回調査していない *gyrB*、*parE* のみならず、外膜ポリンの減少、薬剤排出ポンプの機能亢進など、他の遺伝子の変異による耐性化の可能性が推定された。その可能性を探ることを目的として、緑膿菌の 3 種の薬剤排出ポンプそれぞれの発現の制御に関わる遺伝子として、*mexR*、*mexZ*、*nfxB* の変異の有無を調査した。これらの調節遺伝子のうち *mexR* および *mexZ* の塩基配列には、一塩基変異によるアミノ酸の置換や終止コドンの出現、塩基欠損によるフレームシフトが存在した。これらの調節遺伝子に生じた変異により、それぞれの遺伝子産物であるレプレッサータンパク質がオペレーター配列に結合できなくなれば、薬剤排出ポンプオペロンの過剰発現が起こり、結果として細胞内に取り込まれたキノロンの能動排出亢進によりキノロンに対する耐性度が高まることになる。実際には、GyrA や ParC に変異がなく、*mexZ* 単独あるいは *mexZ* と *mexR* に変異のあった菌株では、キノロン高度耐性の菌株は見ら



れなかった。また *nfxB* のみに変異のある菌株は認められず、*nfxB* に変異のある菌株では今回調査した全ての領域の遺伝子に変異のある菌株であった。なお、*GyrA*、*ParC* さらには薬剤排出ポンプの制御遺伝子の変異が重なるにつれてフルオロキノロン系抗菌薬の MIC 値は高くなり、高度のキノロン耐性を獲得していることが考えられた。

次に、*mexR*、*mexZ*、*nfxB* の変異が薬剤排出ポンプの過剰発現に関わっているかを確認するために Efflux Pump Inhibitor (EPI) を用いて CPFIX の MIC 値の変化を確認した。EPI の添加によって MIC 値が 1/8 以下に低下した場合、薬剤耐性に薬剤排出ポンプの過剰発現が関与しているという報告をもとに検討を行った結果、調査対象の 66 株中 12 株で CPFIX の MIC 値が 1/8 以下に低下した。とくにこれらの中で、*GyrA* の 83 番目に変異があるにも関わらず、さらに薬剤排出ポンプの制御遺伝子にも変異がある株において、EPI の添加によって CPFIX の MIC 値が 3.91 $\mu$ g/mL 未満になった 4 株については、キノロン耐性の主な機構は、抗菌薬の標的分子の変異ではなく薬剤排出ポンプの過剰発現である可能性が示唆された。また、今回調査した全ての領域の遺伝子に変異がなく、かつ EPI の添加によって CPFIX の MIC 値が 3.91 $\mu$ g/mL 未満になった菌株については、*mexR*、*mexZ*、*nfxB* 以外の薬剤排出ポンプ制御系領域の変異が、キノロン耐性の主な機構であることが推測された。

第四章では、同一患者から複数回分離された緑膿菌株について、その特徴を確認すべく、まず hypermutability の確認を行った。緑膿菌臨床分離株において hypermutable strain が存在した場合、感染症の治療に際し抗菌薬の投与を注意深く行う必要がある。本研究では、8 名の患者から複数回検出された緑膿菌株のうち、細菌検査室への検体提出日が早い菌株を中心に変異頻度を測定した結果、17 株中 4 株が hypermutable strain である可能性が高いという結果を得

た。次に、ERIC PCR を行い、同一患者由来の緑膿菌臨床分離株で分離日時の異なる菌株について菌株間の類似性について検討を行った。使用抗菌薬と投与期間、検体材料、検体受付日、mutant frequency、MIC 値 (CPFX、CPFX(with EPI)、PZFX、AMK、MEPM、MINO)、変異位置 (GyrA、ParC、MexR、MexZ、NfxB) および ERIC PCR のバンドの位置を総合的に評価することで、抗菌薬の投与によって遺伝子に変異が起こり耐性を獲得したのか、あるいは経時的な経過の中で別の由来の菌が伝播してきたのかについて詳細な情報を得ることができた。とくに同一患者由来の緑膿菌臨床分離株の経時的変化 (2) では、検体受付日の早い前半の菌株は CPFX 感受性株であるのに対し、後半になるにつれ CPFX 耐性株が多くなっていたことから、様々な抗菌薬の長期投与によって耐性を獲得したことが示唆された。

また、キノロンの投与期間が長期に及ばなくても、耐性化する菌株の存在を確認できた。さらに、一度 GyrA および ParC に変異が起こると、たとえキノロンの投与をしない期間が長期に及んでも、感受性株には戻らないということが確認された。

ERIC PCR による菌株の鑑別を医療現場で応用することにより、院内感染対策における早期介入が可能になると考えられる。

たとえキノロン低度耐性であっても、さらに遺伝子の変異が重なることによって高度耐性になる可能性があるため、こういった場合にはフルオロキノロン系抗菌薬の投与は避けるべきである。

## 第六章 実験の部

### 第一節 実験材料

#### 第1節 使用菌株

2010年9月から2011年9月までに東邦大学医療センター大橋病院細菌検査室に提出された検体から分離された緑膿菌 373 株

#### 第2節 プライマー

PCR primer	Nucleotide sequence	Nucleotide position	
<i>gyrAF</i>	5'-gttttcccagtcacgacgttAGTCCTATCTCGACTACGCGAT-3'	320-341	676-697
<i>gyrAR</i>	5'-AGTCGACGGTTTCCTTTTGAG-3'		
<i>parCF</i>	5'-gttttcccagtcacgacgttCGAGCAGGCCTATCTGAACTAT-3'	214-235	496-517
<i>parCR</i>	5'-GAAGGACTTGGGATCGTCCGGA-3'		
<i>mexRF</i>	5'-tgtaaaacgacggccagtATGAACTACCCCGTGAATCCC-3'	1-21	399-429
<i>mexRR</i>	5'-caggaaacagctatgacCGGTTGCGCGGCCAGGCACTGGTCGAGGAGA-3'		
<i>mexZF</i>	5'-tgtaaaacgacggccagtCCAGGAAAACCAAAGAGGAA-3'	5-24	601-622
<i>mexZR</i>	5'-caggaaacagctatgacCCAGCAACAGGTAGGGAGAACT-3'		
<i>nfxBF</i>	5'-tgtaaaacgacggccagtATGACCCTGATTTCCCATGA-3'	1-20	439-456
<i>nfxBR</i>	5'-caggaaacagctatgacCACCAGGGTGATGAACAG-3'		
ERIC-1R	5'-CACTTAGGGTCCTCGAATGTA-3'		
ERIC-2	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'		
M13M4	5'-GTTTTCCAGTCACGACGTTG-3'		
M13(-21)	5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3'		

### 第3節 使用培地

\*試薬は、断りのない限り Wako(和光純薬工業)を使用した。

#### ①Luria-bertani broth (LB)

Bacto™ tryptone 10.0 g

Bacto™ yeast extract 5.0 g

NaCl 5.0 g

Distilled water to 1000mL, adjust pH to 7.2 with NaOH, autoclave.

(LA=LB+1.6% agar)

#### ②Mueller Hinton broth (MHB)

Mueller Hinton Broth(Difco) 21.0 g

Distilled water to 1000 mL, autoclave.

(MHA=MHB+1.6% agar)

#### ③NAC AGAR ‘栄研’

NAC AGAR 35.8 g

Distilled water to 1000 mL.

#### ④マッコンキー寒天培地

マッコンキー寒天培地 ‘栄研’ 50.0 g

Distilled water to 1000 mL, autoclave.

#### 第4節 使用緩衝液

##### ①TE buffer

Tris-HCl (2.0 M, pH 8.0) 5.0 mL

EDTA · 2Na (0.5 M, pH 8.0) 2.0 mL

Distilled water to 1000 mL, autoclave.

##### ② 50×TAE buffer

Tris base 242.0 g

gracial AcOH 57.1 mL

EDTA · 2Na (0.5 M, pH 8.0) 100.0 mL

Distilled water to 1000 mL, autoclave.

#### 第5節 使用抗菌薬

\* 試薬は、断りのない限り Wako(和光純薬工業)を使用した。

・ Ciprofloxacin Hydrochloride Monohydrate(CPFX)

・ Pazufloxacin Mesilate (富山化学工業) (PZFX)

・ Amikacin Sulfate(AMK)

・ Meropenem Trihydrate(MEPM)

・ Minocycline Hydrochloride(MINO)

・ Rifampicin

#### 第6節 遺伝子操作用、電気泳動用試薬

・ Agarose L03 「TAKARA」

## 第7節 使用機器

- ・遠心分離には SAKUMA M- 150、BECKMAN Avanti®J-E を使用した。
- ・振とう培養には TAITEC MM- 10、BR- 300LF を使用した。
- ・電気泳動には東洋紡 GelMate® 2000 泳動槽を使用した。
- ・UV ゲル撮影には GelDoc XR(BIO-RAD)を使用した。
- ・Sequencer は Applied Biosystems 3500/3500xL を使用した。
- ・PCR には Applied Biosystem GeneAmp® PCR system 9700 を使用した。
- ・DNA の乾燥に SAKUMA EC- 57C 遠心エバポレーターを使用した。
- ・恒温槽には Cool Thermo Unit CTU-Neo(TAITEC)、SANYO INCUBATOR MIR-254 を使用した。
- ・OD 測定には Gene Quant 1300(GE ヘルスケア・ジャパン)を使用した。

## 第8節 その他

- ・EPI(Efflux Pump Inhibitor)として phenylalanine arginyl  $\beta$ -naphthylamide dihydrochloride(SIGMA-ALDRICH)を使用した。
- ・MEPM の pH 調整には、炭酸ナトリウム(半井化学薬品株式会社)を使用した。
- ・Rifampicin の溶解には、Dimethyl Sulfoxide(Wako)を使用した。

## 第二節 実験方法

### 第1節 MIC値測定

[試薬・培地]

- ・ MHB
- ・ MHA
- ・ Ciprofloxacin Hydrochloride Monohydrate(CPFX)
- ・ Pazufloxacin Mesilate (PZFX)
- ・ Amikacin Sulfate(AMK)
- ・ Meropenem Trihydrate(MEPM)
- ・ Minocycline Hydrochloride(MINO)
- ・ 炭酸ナトリウム

[方法]

1. 小試験管に 2 mL の MHB を分注し、緑膿菌分離株を接種して一晩培養した。

2. 抗菌薬の希釈・培地作り

①CPFX 原液(25 mg/mL)、PZFX 原液(25 mg/mL)、AMK 原液(50 mg/mL)、

\*MEPM 原液(50 mg/mL)を調製した。

* MEPM	25 mg
炭酸ナトリウム	5.2 mg
滅菌水	ad. 500 $\mu$ L

②1.5 mL エッペンチューブを抗菌薬の希釈液の本数分用意し、各々に滅菌水を 200 $\mu$ L ずつ分注した。

③①で調製した抗菌薬の原液を 200 $\mu$ L 取り、②のエッペンチューブの 1 本に加え希釈液 1 とした。

④希釈液 1 を 200 $\mu$ L 取り、同様の手順で、CPFX・PZFX は希釈液 1～12、AMK・MEPM は希釈液 1～9、MINO は希釈液 1～4 を調製した。

(Table. 17)

③それぞれの希釈液を 100  $\mu$ L ずつシャーレに入れ、20 mL の MHA を入れて良く混ぜ、固まったらクリーンベンチ内で乾燥させた。

④コントロールとして MHA 培地を 1 枚用意した。

Table. 17 寒天培地内の抗菌薬濃度 ( $\mu$ g/mL)

	CPFX・PZFX	AMK・MEPM	MINO
1	62.5	125	200
2	31.25	62.5	100
3	15.6	31.25	50
4	7.81	15.6	25
5	3.91	7.81	—
6	1.95	3.91	—
7	0.98	1.95	—
8	0.49	0.98	—
9	0.24	0.49	—
10	0.12	—	—
11	0.06	—	—
12	0.03	—	—

### 3. 菌液の希釈

①スクリーキャップボトルに 1mL の滅菌水を入れた。

②一晩培養した菌液を十分に攪拌したのち 10 $\mu$ L 分注し、①に加えて混合した。

### 4. MIC 値の測定

①菌株番号を振ったマトリックスを、抗菌薬を混ぜて固まらせたシャーレの底面に張り付けた。



②寒天培地上の各番号を振った場所に菌液を 2 $\mu$ L 落とし、37 $^{\circ}$ Cの恒温室で18時間以上培養し、MIC 値を測定した。

## 第2節 DNA Sequencing

### 1) colony-PCR

[試薬・キット]

- ・ MHB
- ・ KOD FX (東洋紡)

[primer]

- ・ *gyrAF/gyrAR*
- ・ *parCF/parCR*
- ・ *mexRF/mexRR*
- ・ *mexZF/mexZR*
- ・ *nfxBF/nfxBR*

[使用機器]

- ・ Applied Biosystem GeneAmp $^{\circledR}$  PCR system 9700

[操作]

①小試験管に 2 mL の MHB を分注し、緑膿菌分離株を接種して一晩培養した。

②PCR 用チューブに下記の試薬を混合した。

KOD FX	0.5 $\mu$ L
KOD FX Buffer	12.5 $\mu$ L
2mM dNTPs	2.5 $\mu$ L
primer F	0.25 $\mu$ L

primer R                    0.25  $\mu$ L  
滅菌水                    9.0  $\mu$ L     / 25  $\mu$ L

③1.5 mL エッペンチューブに菌液を入れ、15000 rpm、10 min.で遠心し、集菌した。

上清液を廃棄し、つまようじの先端で集菌した菌を採取し、②の混合液に懸濁した。

④チューブを機器にセットし、下記の条件で反応を行った。

95°C → 98°C → 55°C → 74°C → 74°C → 4°C  
2 min.    10 sec.    30 sec.    \*30 sec.    2 min.  
└──────────────────────────┘  
× 40 cycles

## 2)アガロースゲル電気泳動(確認)

### [試薬]

- 1×TAE buffer
- 50×TAE buffer 20 mL
- distilled water to 1000 mL
- Agarose
- 10×Loading buffer
- Ethidium Bromide 染色液

### [操作]

①Agarose を 1×TAE buffer に加温溶解し 1%のアガロースゲルを作成した。

②3  $\mu$ L サンプル DNA に 1  $\mu$ L 10×Loading buffer を加え、アガロース

ゲルにアプライし、100 V の定電圧で 40 min.泳動を行った。

③アガロースゲルを Ethidium Bromide 染色液に 10～15 min.浸した。

④トランスイルミネーターにより UV 照射下、写真撮影を行った。

⑤DNA 断片のサイズ測定は分子量マーカーとして 500 bp DNA Ladder (宝酒造)を用いて行った。

### 3)アガロースゲル電気泳動(切り出し)

#### [試薬]

・ 1×TAE buffer

50×TAE buffer 20 mL

distilled water to 1000 mL

・ Agarose

・ 10×Loading buffer

・ Ethidium Bromide 染色液

#### [操作]

①Agarose を 1×TAE buffer に加温溶解し 1%のアガロースゲルを作成した。

②全量のサンプル DNA に 3  $\mu$ L 10×Loading buffer を加え、アガロースゲルにアプライし、50 V の定電圧で 90 min.泳動を行った。

③アガロースゲルを Ethidium Bromide 染色液に 10～15 min.浸した。

④トランスイルミネーターにより UV 照射下、写真撮影を行った。

⑤DNA 断片のサイズ測定は分子量マーカーとして 500 bp DNA Ladder (宝酒造)を用いて行った。

⑥目的の分子量のバンドを切り出して 1.5 mL エッペンチューブに保存

した。

#### 4)PCR 産物の精製

[キット]

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

[操作]

- ①PCR product と等量の Membrane Binding Solution を加えた。
- ②キットのカラムをチューブに差し込み①の液を吸着させ、室温で 1 min.放置した。
- ③14000 rpm、1 min.遠心し、チューブにたまった液を捨てた。
- ④カラムをチューブに戻し 700  $\mu$ L Membrane Wash Solution を加え、14000 rpm、1 min.遠心した。
- ⑤チューブにたまった液を捨て、500  $\mu$ L Membrane Wash Solution を加え 14000 rpm、5 min.遠心した。
- ⑥チューブにたまった液を捨て 14000 rpm、5 min.遠心した。
- ⑦新しい 1.5 mL エッペンチューブにカラムを移し、遠心エバポレーターで 10 min.乾燥させた。
- ⑧40  $\mu$ L の Nuclease Free Water を加え 1 min.室温で放置後、14000 rpm、1 min.遠心した。
- ⑨アガロースゲル電気泳動(確認)を行った。

#### 5)Dideoxy 法による塩基配列の決定

[試薬]

- Ready Reaction Mix ver 1.1

• Primer M13M4 or M13(-21) (1pmol/μL)

• SAM sol.

• BigDye XTerminator

[primer]

• M13M4 : *gyrA* 及び *parC* に使用

• M13(-21) : *mexR*, *mexZ* 及び *nfxB* に使用

[使用機器]

• Applied Biosystem GeneAmp® PCR system 9700

• Applied Biosystems 3500/3500xL

[操作]

①以下の試薬を 8 連チューブに混合した。

Ready Reaction Mix	8 μL
Primer	4 μL
滅菌水	6 μL
Template	2 μL / 20 μL

②チューブを機器にセットし、下記の条件で反応を行った。

96°C → 96°C → 50°C → 60°C → 4°C

1 min. 10 sec. 5 sec. 4 min.

┌──────────────────────────┐

× 25 cycles

③80 μL SAM sol , 15 μL BigDye XTerminator を加えた。

④8 連チューブ用のふたをした後、手でよく混ぜた。

⑤Vortex で 15 min.混合した。(この間に ABI3500 本体、PC をセットアップした)

⑥⑤を 2 min.遠心した。

⑦プレートアッセンブリを組み立てた。

⑧ABI3500 のデッキにセットし、泳動を行った。

### 第 3 節 Efflux Pump Inhibitor (EPI)を用いた MIC 値測定

[試薬・培地]

・ MHB

・ MHA

・ NAC AGAR

・ Ciprofloxacin Hydrochloride Monohydrate(CPFX)

・ EPI: phenylalanine arginyl  $\beta$  - naphthylamide dihydrochloride

[方法]

1. 小試験管に 2 mL の MHB を分注し、緑膿菌分離株を接種して一晩培養した。

2. 抗菌薬の希釈・培地作り

①CPFX 原液(25 mg/mL)、EPI(4 mg/mL)を調製した。

②1.5 mL エッペンチューブを 12 本用意し、各々に滅菌水を 200 $\mu$ L ずつ分注した。

③①で調製した抗菌薬の原液を 200 $\mu$ L 取り、②のエッペンチューブの 1 本に加え希釈液 1 とした。

④希釈液 1 を 200 $\mu$ L 取り、同様の手順で、希釈液 1~12 を調製した。

⑤・ EPI 添加なし(比較用):それぞれの希釈液を 100  $\mu$ L ずつシャーレに入れ、20 mL の MHA を入れて良く混ぜ、固まったらクリーンベンチ内で乾燥させた。

・EPI 添加あり:100  $\mu\text{L}$  の EPI とそれぞれの希釈液を 100  $\mu\text{L}$  ずつシャーレに入れ、20 mL の MHA を入れて良く混ぜ、固まったらクリーンベンチ内で乾燥させた。

\*最終濃度は Table.17 参照

⑥コントロールとして NAC 寒天培地を 1 枚用意した。

### 3. 菌液の希釈

①スクリューキャップボトルに 1 mL の滅菌水を入れた。

②一晚培養した菌液を十分に攪拌したのち 10 $\mu\text{L}$  分注し、①に加えて混合した。

### 4. MIC 値の測定

①菌株番号を振ったマトリックスを、抗菌薬を混ぜて固まらせたシャーレの底面に張り付けた。

②寒天培地上の各番号を振った場所に菌液を 2 $\mu\text{L}$  落とし、37 $^{\circ}\text{C}$  の恒温室で 18 時間以上培養し、MIC 値を測定した。

③EPI 添加なしと EPI 添加ありの MIC 値を比較した。

## 第 4 節 Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) PCR

### 1)ERIC-PCR

[試薬・キット]

- ・ MHB
- ・ KOD FX (東洋紡)

[primer]

- ・ ERIC-1R / ERIC-2

[使用機器]

・ Applied Biosystem GeneAmp® PCR system 9700

[操作]

①小試験管に 2 mL の MHB を分注し、緑膿菌分離株を接種して一晩培養した。

②PCR 用チューブに下記の試薬を混合した。

KOD FX	0.5 $\mu$ L	
KOD FX Buffer	12.5 $\mu$ L	
2mM dNTPs	2.5 $\mu$ L	
primer F	0.25 $\mu$ L	
primer R	0.25 $\mu$ L	
滅菌水	9.0 $\mu$ L	/ 25 $\mu$ L

③1.5 mL エッペンチューブに菌液を入れ、15000 rpm、10 min で遠心し、集菌した。

上清液を廃棄し、つまようじの先端で集菌した菌を採取し、②の混合液に懸濁した。

④チューブを機器にセットし、下記の条件で反応を行った。

95°C → 98°C → 52°C → 74°C → 74°C → 4°C

2 min.    10 sec.    1 min.    \*30 sec.    2 min.



× 40 cycles

2)アガロースゲル電気泳動

[試薬]

・ 1×TAE buffer



50×TAE buffer 20 mL

distilled water to 1000 mL

- Agarose
- 10×Loading buffer
- Ethidium Bromide 染色液

[操作]

①Agarose を 1×TAE buffer に加温溶解し 2%のアガロースゲルを作成した。

②10 μL サンプル DNA に 3 μL 10×Loading buffer を加え、アガロースゲルにアプライし、50 V の定電圧で 90 min.泳動を行った。

③アガロースゲルを Ethidium Bromide 染色液に 20 min.浸し、さらに精製水に 10 min.浸した。

④トランスイルミネーターにより UV 照射下、写真撮影を行った。

⑤DNA 断片のサイズ測定は分子量マーカーとして 0.1~20kbp Gene Ladder Wide 2 (Wako)を用いて行った。

## 第 5 節 Hypermotability の確認

[試薬]

- LB
- LA
- Rifampicin
- Dimethyl Sulfoxide

[使用機器]

- Gene Quant 1300

## [操作]

1. 小試験管に 2 mL の LB を分注し、緑膿菌分離株を接種して一晩培養した。
2. 15 mL のコーニングチューブに Rifampicin 30 mg/mL(Dimethyl Sulfoxide で溶解)を作成した。
3. 菌液の調製
  - ①1.5 mL のエッペンチューブに菌液 1mL を入れた。
  - ②15,000 rpm、10 min. で遠心し集菌した。
  - ③上清を捨てて、1 mL の LB を入れて再懸濁し、原液とした。(wash)
  - ④原液 100  $\mu$ L に対して、LB を 900  $\mu$ L 入れて 10 倍希釈液を作り、更に  $10^6$  倍希釈液まで作成した。
4. 1 検体あたり、Rifampicin(30 mg/mL)を 200  $\mu$ L 入れた LA+Rifampicin 20 mL (300  $\mu$ g/mL)のシャーレを 2 枚と LA20 mL のシャーレを 3 枚用意した。
5. LA+Rifampicin 20 mL(300  $\mu$ g/mL)のシャーレ 2 枚に原液 100  $\mu$ L ずつコンラージ棒で塗布し、LA 20 mL のシャーレ 3 枚に  $10^6$  倍希釈液 100  $\mu$ L ずつコンラージ棒で塗布した。
6. 10 倍希釈液 1 mL ずつ OD<sub>600</sub> 測定した。(ブランクは LB)
7. 37°C 恒温室で 36 時間培養後、生菌数をカウントし平均値を出した。

## 第七章 参考文献

1. 加藤文男・西川朱實 編、第6版 薬科微生物学、丸善、東京、2013
2. Hitoshi Sagai, V. Krcmery, Katsumi Hasuda, Shizuko Iyobe, H. Knothe, Susumu Mitsuhashi. R Factor-Mediated Resistance to Aminoglycoside Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn J Microbiol.* 1975 Jun;19 (6):427-432.
3. George A. Jacoby. Properties of an R Plasmid in *Pseudomonas aeruginosa* Producing Amikacin (BB-K8), Butirosin, Kanamycin, Tobramycin, and Sisomicin Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1974 Dec; 6(6):807-810.
4. S. Minami, M. Akama, H. Araki, Y. Watanabe, H. Narita, S. Iyobec and S. Mitsuhashi. Imipenem and cephem resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying plasmids coding for class B  $\beta$ -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 1996;37:433-444.
5. 厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業(Japan Nosocomial Infections Surveillance: JANIS). 2000.
6. 国立感染症研究所 感染症情報センターHP
7. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999 May;284(5418):1318-1322.
8. Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, Greenberg EP. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature.* 2001 Oct;413(6858):860-864.
9. R C Clowes. Molecular structure of bacterial plasmids. *Bacteriol. Rev.* 1972 Sep;36(3):361-405.
10. D M Livermore. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995 Oct; 8(4):557-584.
11. Labia R, Morand A, Tiwari K, Pitton JS, Sirot D, Sirot J. Kinetic properties of two plasmid-mediated beta-lactamases from *Klebsiella pneumoniae* with strong activity against third-generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother.* 1988 Mar; 21(3):301-307.
12. Howard S. Gold, M.D., and Robert C. Moellering, Jr., M.D. Antimicrobial -Drug Resistance. *N Engl J Med.* 1996 Nov; 335:1445-1453.

13. 荒川 宜親. 拡張型基質特異性を示す  $\beta$ -ラクタマーゼの出現. 化学療法の領域. 1996, 12(7):37~45.
14. T Yagi, H Kurokawa, K Senda, S Ichiyama, H Ito, S Ohsuka, K Shibayama, K Shimokata, N Kato, M Ohta and Y Arakawa. Nosocomial spread of cephem-resistant *Escherichia coli* strains carrying multiple Toho-1-like beta-lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Dec; 41(12): 2606-2611.
15. Y Ishii, A Ohno, H Taguchi, S Imajo, M Ishiguro and H Matsuzawa. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Oct; 39(10): 2269-2275.
16. B A Rasmussen and K Bush. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Feb; 41(2): 223-232.
17. K Senda, Y Arakawa, S Ichiyama, K Nakashima, H Ito, S Ohsuka, K Shimokata, N Kato, and M Ohta . PCR detection of metallo-  $\beta$  -lactamase gene (*bla* IMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum  $\beta$  -lactams. *J.Clin.Microbiol.* 1996 Dec; 34(12):2909-2913.
18. H Ito, Y Arakawa, S Ohsuka, R Wacharotayankun, N Kato, and M Ohta. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene *bla*IMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Apr; 39(4): 824-829.
19. K Kimura, Y Arakawa, S Ohsuka, H Ito, K Suzuki, H Kurokawa, N Kato, and M Ohta. Molecular aspects of high-level resistance to sulbactam-cefoperazone in *Klebsiella oxytoca* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 Sep; 40(9): 1988-1994.
20. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* 1998 Mar; 351(9105): 797-799.
21. 平井敬二. キノロン系薬の作用機序と耐性機構研究の歴史. 日本化学療法学会雑誌. 2005 Jun:349-356.
22. B L Angus, A M Carey, D A Caron, A M Kropinski, and R E Hancock. Outer membrane permeability in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison

- of a wild-type with an antibiotic-supersusceptible mutant. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982 Feb;21(2):299-309.
23. F Yoshimura and H Nikaido. Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. *J Bacteriol.* 1982 Nov;152(2):636-642.
  24. Nikaido H, Nikaido K, Harayama S. Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* 1991 Jan;266(2):770-779.
  25. Martina M. Ochs, Matthew P. McCusker, Manjeet Bains, and Robert E. W. Hancock. Negative Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Porin OprD Selective for Imipenem and Basic Amino Acids. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 May;43(5):1085-1090.
  26. K Hirai, S Suzue, T Irikura, S Iyobe, and S Mitsuhashi. Mutations producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987 Apr; 31(4): 582-586.
  27. H Fukuda, M Hosaka, K Hirai, and S Iyobe. New norfloxacin resistance gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990 Sep; 34(9): 1757-1761.
  28. N Gotoh, H Tsujimoto, K Poole, J Yamagishi, and T Nishino. The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by *oprK* of the *mexA-mexB-oprK* multidrug resistance operon. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Nov; 39(11): 2567-2569.
  29. 後藤直正. *Pseudomonas aeruginosa* の多剤耐性化に寄与する薬剤排出システム。日化療会誌 2004; 47: 319-328.
  30. Martin Gellert, Kiyoshi Mizuuchi, Mary H. O'Dea, Tateo Itoh, and Jun-Ichi Tomizawa. Nalidixic acid resistance: A second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Nov; 74(11): 4772-4776.
  31. Sugino A, Peebles CL, Kreuzer KN, Cozzarelli NR. Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli nalA* gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A*. 1977 Nov;74(11):4767-4771.
32. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S. Quinolone resistance -determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990 Jun;34 (6):1271-1272.
  33. 吉田博明. 細菌におけるキノロン耐性メカニズム. 日本細菌学雑誌. 1996 51(4):973 -992.
  34. Hirai K, Mitsunashi S. Mechanisms of resistance to quinolones. *Progress in Drug Research*. 1992; 38:107-120.
  35. Kato J, Nishimura Y, Imamura R, Niki H, Hiraga S, Suzuki H. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell*. 1990 Oct 19;63(2):393-404.
  36. 松本哲哉, 舘田一博. 多剤耐性緑膿菌. 治療. 2000;82(増):454-461
  37. Noriyuki Abe, Masaru Komatsu, Mizuho Iwasaki, Yoko Nagasaka, Saori Fukuda and Shuji Matsuo. In vitro activity of antimicrobial agents against clinical isolates Of *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn. J. Antibiotics*. 2005;58(5):445-451.
  38. Isamu Yoshida, Takaji Fujimura, Yoshihisa Itoh, Mineji Tachibana, Mitsuo Kaku, Keiji Kanemitsu, Choichiro Takahashi, Joji Shiotani, Yuka Ono, Hisashi Baba, Shuji Matsuo, Seishi Asari, Kimiko Matsuoka, Nobuchika Kusano, Motoko Nose, Tetsunori Saikawa, Kazufumi Hiramatsu, Shigeru Kohno, Yoichi Hirakata, Nobuhisa Yamane, Isamu Nakasone and Yoshinori Yamano. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of aerobic Gram-negative bacteria in 2004. *Jpn. J. Infect and Chemother*. 2008 Sep;56(5):562-579.
  39. Akiko Kanayam, Misuzu Kid, Takako Iyod, Kaoru Matsuzaki, Shunsuke Shibuya, Miyuki Hasegawa, Takeshi Saika, Fumiaki Ikeda and Intetsu Kobayashi. Annual changes in drug susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from blood and other clinical specimens. *Jpn. J. Infect and Chemother*. 2010 Jan;58(1):7-13.
  40. Harvey Lodish, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. *Molecular Cell Biology*, 4th edition.

New York: W. H. Freeman; 2000.

41. Wong A, Kassen R. Parallel evolution and local differentiation in quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 2011 Apr;157(4):937-944.
42. Kureishi A, Diver JM, Beckthold B, Schollaardt T, Bryan LE. Cloning and nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* DNA gyrase *gyrA* gene from strain PAO1 and quinolone-resistant clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994 Sep;38(9):1944-1952.
43. Takaaki Akasaka, Yoshikuni Onodera, Mayumi Tanaka, and Kenichi Sato. Cloning, Expression, and Enzymatic Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Mar; 43(3): 530-536.
44. M Nakano, T Deguchi, T Kawamura, M Yasuda, M Kimura, Y Okano, and Y Kawada. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Oct; 41(10): 2289-2291.
45. Linda M. Weigel, Christine D. Steward, and Fred C. Tenover. *gyrA* Mutations Associated with Fluoroquinolone Resistance in Eight Species of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Oct; 42(10): 2661-2667.
46. Pan XS, Ambler J, Mehtar S, Fisher LM. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Oct;40(10):2321-2326.
47. Hideyuki Fukuda, Satoshi Hori and Keiichi Hiramatsu. Antibacterial Activity of Gatifloxacin (AM-1155, CG5501, BMS-206584), a Newly Developed Fluoroquinolone, against Sequentially Acquired Quinolone-Resistant Mutants and the *norA* Transformant of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1998Aug; 42(8): 1917-1922.
48. H Yoshida, M Bogaki, M Nakamura, L M Yamanaka and S Nakamura. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene

- of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991 Aug; 35(8): 1647-1650.
49. Patrizia Spigaglia, Fabrizio Barbanti, Thomas Louie, Frédéric Barbut and Paola Mastrantonio. Molecular Analysis of the *gyrA* and *gyrB* Quinolone Resistance-Determining Regions of Fluoroquinolone-Resistant *Clostridium difficile* Mutants Selected In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2009 Jun;53(6):2463-2468.
  50. Seidu Malik, Melisa Willby, David Sikes, Oleg V. Tsodikov, James E. Posey. New Insights into Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Functional Genetic Analysis of *gyrA* and *gyrB* Mutations. PLoS ONE. 2012 Jun;7(6):1-10
  51. Deborah J. Eaves, Luke Randall, Douglas T. Gray, Antony Buckley, Martin J. Woodward, Allan P. White and Laura J. V. Piddock. Prevalence of Mutations within the Quinolone Resistance-Determining Region of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and Association with Antibiotic Resistance in Quinolone-Resistant *Salmonella enterica*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2004 Oct;48(10):4012-4015.
  52. Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res*. 2003 Mar;2(1):48-62.
  53. Olga Lomovskaya, Mark S. Warren, Angela Lee, Jorge Galazzo, Richard Fronko, May Lee, Johanne Blais, Deidre Cho, Suzanne Chamberland, Tom Renau, Roger Leger, Scott Hecker, Will Watkins, Kazuki Hoshino, Hiroko Ishida and Ving J. Lee. Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2001 Jan;45(1):105-116.
  54. Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W and Wiedemann B. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Nov;51(11):4062-4070.
  55. Tohidpour A, Najar Peerayeh S, Mehrabadi JF and Rezaei Yazdi H.



- Determination of the efflux pump-mediated resistance prevalence in *Pseudomonas aeruginosa*, using an efflux pump inhibitor. *Curr Microbiol.* 2009 Sep;59(3):352-355.
56. P Y Liu, Z Y Shi, Y J Lau, B S Hu, J M Shyr, W S Tsai, Y H Lin and C Y Tseng. Comparison of different PCR approaches for characterization of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33(12):3304-3307.
57. Syrnis MW, O'Carroll MR, Sloots TP, Coulter C, Wainwright CE, Bell SC, Nissen MD. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. *J Med Microbiol.* 2004 Nov;53(11):1089-1096.
58. Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Nov;51(11):4062-4070.

## 謝 辞

本研究の開始以来、今日に至るまで御指導、御鞭撻を賜りました、東邦大学薬学部微生物学教室 加藤文男教授に、謹んで感謝の意を表します。

本論文の御校閲を賜り、数多くの御指導を頂戴いたしました、東邦大学薬学部臨床薬学研修センター 柳川忠二教授、ならびに、石井敏浩教授に、謹んで感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、懇切なるご指導、有益なご助言を賜りました、東邦大学薬学部微生物学教室 安齊洋次郎准教授に、心より感謝申し上げます。

著者の大学院進学および研究の遂行に、多大なるご理解とご助言を頂きました、ファーマクラスター株式会社 浅山亨取締役副社長に、心より感謝申し上げます。

緑膿菌の貴重な臨床株を分譲して頂きました、東邦大学医療センター大橋病院臨床検査部細菌検査室 大塚昌信氏、吉田美江子氏、伊藤志昂氏に、心より感謝申し上げます。

本研究を遂行する上で多大なご協力をしてくださいました、微生物学教室卒業生ならびに学生 磯崎未帆氏、福田達也氏、近藤静香氏、佐野祐希羽氏、宮内理沙氏に心より感謝申し上げます。

最後に、今日まで応援してくれた、家族に感謝いたします。