

状況にはないと予想されるが、今後、この塩基置換部分を検知する迅速簡便な方法を確立し、モニタリングをしていく必要がある。

#### E. 結論

1. MRSAのAG耐性因子はAME（修飾酵素）遺伝子で、中でもほとんどのAGを不活化する*aac(6')/aph(2'')*が最大の因子であり、その遺伝子のモニタリングがMRSAのAG耐性を把握し制御する上で最も肝要不可欠である。
2. MRSAのAME遺伝子プロファイルは、コアグララーゼ遺伝子型に連動する固有性があり、*aac(6')/aph(2'')*は80年代にメジャーであった数種の型の菌株に頻度高く検出され、90年代に支配的となったL21型の菌株の保持率は低いことが認められた。
3. そのため、*aac(6')/aph(2'')*をもつ菌株は長期低落傾向にあり、結果的にGMやABKに対する耐性菌が減少傾向にある。特に、ABKはこの遺伝子をもつ菌株に対しても有効性が高く、今後もしばらくは耐性化の進行はないと予想される。
3. MRSAのAG耐性情報を得るには、AME遺伝子とコアグララーゼ遺伝子型の迅速簡便な検出・型別法の存在が不可欠の条件であるが、本プロジェクトにおいて確立したMultiplex Colony Direct (CD) PCRによるAME遺伝子プロファイルのチェックとCD-PCR *Alu I*-RFLPによるコアグララーゼ遺伝子の型別は非常に有用と判断される。

F. 健康危険情報：なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 土崎尚史、石川淳、堀田国元：コロニーPCR法によるMRSAおよび腸球菌の薬剤耐性遺伝子の迅速検出。Jpn. J. Antibiot. 53: 422-429 (2000)
- 2) 堀田国元、土崎尚史、石野敬子：MRSAのアルベカシン体制化はなぜ進行しないのか。月刊薬事 44: 1263-1267 (2002)
- 3) 土崎尚史、堀田国元：Colony direct-PCRによる黄色ブドウ球菌の遺伝子プロファイル解析。TOYOBO UPLOAD No. 69, pp. 9-10 (2002)
- 4) Hotta K; Tsuchizaki N, Ishino K & Ishikawa J: Why is MRSA unsuccessful to develop arbekacin resistance. J. Infection & Chemotherapy. Accepted.

##### 2. 学会発表

- 1) 堀田国元：MRSAのアルベカシン耐性化はなぜ進行しないのか。日本薬学会122年会、2002年3月、幕張（千葉）。
- 2) 堀田国元、土崎尚史、和田昭仁、荒川宜親：MRSAのアミノグリコシド修飾酵素遺伝子プロファイルとアミノグリコシド耐性の相関性。第75回日本細菌学会総会、2002年4月、横浜。
- 3) 堀田国元、土崎尚史、石野敬子、朴春成、菊池賢、戸塚恭一：黄色ブドウ球菌におけるアミノグリコシド修飾酵素遺伝子と耐性の相関性からみたアルベカシンの特異性。第50回日本化学療法学会総会、2002年5月、神戸。
- 4) Hotta K; N Tsuchizaki, K Ishino, F Saitoh, A Wada & Y Arakawa: Arbekacin, a semisynthetic aminoglycoside, continues to be a good anti-MRSA drug in Japan? The 2003 General Meeting of ICAAC. 2003年9月、San Diego (USA)
- 5) Ishino K; N Tsuchizaki, Bok S, Kikuchi K, Totsumi K & Hotta K: Relationship between Aminoglycoside (AG) Resistance and AG Modifying Enzyme Gene Profiles in MRSA. 10<sup>th</sup> International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. 2002年10月、筑波。

##### 参考文献

1. 堀田国元、石川淳、石井亮一、斎藤文子、吉良清子、荒川宜親、池康嘉：アルベカシン耐性MRSAの判定における問題点とPCR検定の必要性と有用性。Jpn. J. Antibiot. 52: 525-532 (1999).
2. Song, M.D.; M. Wachi, M. Doi, F. Ishino & M. Matsubashi: Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. FEBS Lett. 221: 167-171 (1987).
3. Rouch, DA; ME Byrne, YC Kong & RA Skurray: The *aacA-aphD* gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: expression and nucleotide sequence analysis. J. Gen. Microbiol. 133: 3039-52 (1987).
4. Vanhoof, R; C Godard, J Content, HJ Nyssen & E Hannecart-pokorni: Detection by polymerase chain reaction of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in methicillin-re-

sistant *Staphylococcus aureus* isolates of epidemic phage types. J. Med. Microbiol. 41: 282-290 (1994).

5. Hookey JV; JF Richardson, BD Cookson: Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based

on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. J. Clin. Microbiol. 36: 1083-1089 (1998).

表1. 標的遺伝子とPCRプライマー

標的遺伝子	遺伝子産物	プライマー	PCR産物	文献
<i>mecA</i>	PBP2'	Forward: 5'-TGTCGGTAACCTGAATCAGC-3' Reverse: 5'-TGCTATCCACCCTCAAACAG-3'	519 bp	1, 2
<i>aac(6'')/aph(2'')</i>	AAC(6'')/APH(2'')	Forward: 5'-TACAGAGCCTTGGGAAGATG-3' Reverse: 5'-CATTGTGGCATTATCATCATATC-3'	407	1, 3
<i>aph(3'')-III</i>	APH(3'')-III	Forward: 5'-CTGATCGAAAAATACCGCTGC-3' Reverse: 5'-TCATACTCTCCGAGCAAAGG-3'	269	4
<i>aad(4',4'')</i>	AAD(4',4'')	Forward: 5'-CTGCTAAATCGGTAGAAGC-3' Reverse: 5'-CAGACCAATCAACATGGCACC-3'	174	4
<i>coa</i>	Coagulase	Forward: 5'-ATAGAGATGCTGGTACAGG-3' Reverse: 5'-GCTTCCGATTGTTCCGATGC-3'	?	5

表2. PCR条件

構成分	終濃度	耐性遺伝子 増幅液	coa遺伝子 増幅液
10x PCR Buffer	1 x	+	+
dNTPs	各0.2mM	+	+
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 mM	+	+
DNA polymerase (KOD-Plus-)	0.4U	+	+
Primers			
mecA F & R	各0.2 μM	+	-
aac(6')/aph(6') F & R	各0.5 μM	+	-
aph(3')-III F & R	各0.2 μM	+	-
aad(4',4'') F & R	各0.2 μM	+	-
coa F & R	各0.2 μM	-	+
反応液量		20 μl	20 μl

反応条件: 95°C,3分→ (95°C,30秒→ 50°C, 30秒→ 68°C, 1分)× 30サイクル

表3. MRSAにおけるアミノグリコシド修飾酵素遺伝子プロフィルの分布

AME遺伝子プロフィル	総数	L21	非L21:	L22	L31	M22
	443	337	106	37	23	16
<i>aph(3')</i>	0.5%	0 %	1.9%	5.4%	0 %	0 %
<i>aad(4',4'')</i>	42.7	54.3	5.7	0	8.7	0
<i>aph(3') + aad(4')</i>	0	0	0	0	0	0
<i>aac(6')/aph(2'')</i>	13.8	5.3	40.6	43.2	73.9	25
<i>aac(6')/aph(2'') + aph(3')</i>	3.6	0	15.1	37.8	8.7	0
<i>aac(6')/aph(2'') + aad(4')</i>	34.8	36.8	28.3	2.7	0	75
<i>aac(6')/aph(2'') + aph(3') + aad(4')</i>	0.5	0	1.9	5.4	0	0
<i>aph(3')</i> トータル	4.6%	0 %	18.9%	5.4%	8.7%	0 %
<i>aad(4',4'')</i> トータル	78.0	91.1	35.9	48.6	8.7	75
<i>aac(6')/aph(2'')</i> トータル	52.7	42.1	85.9	89.1	82.6	100

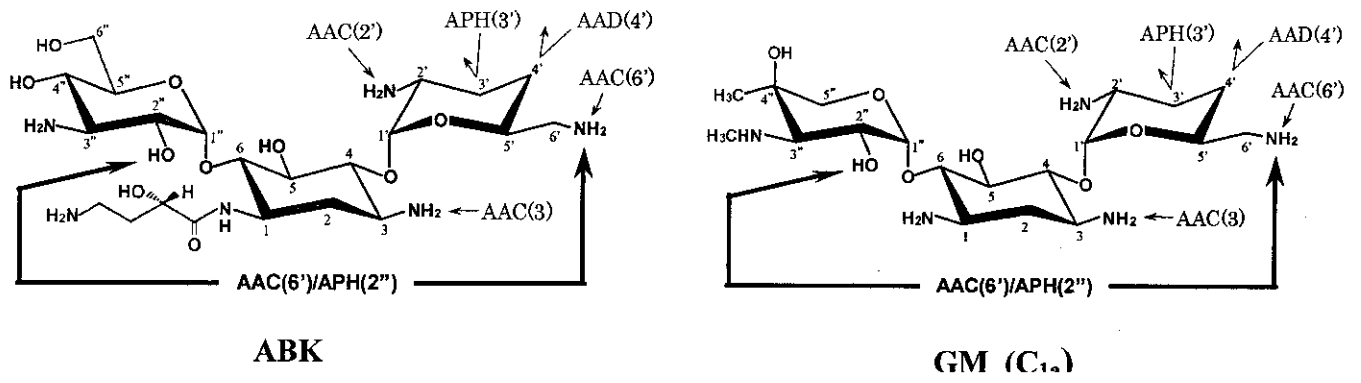


図1. ABKとGMの構造と酵素的修飾部位

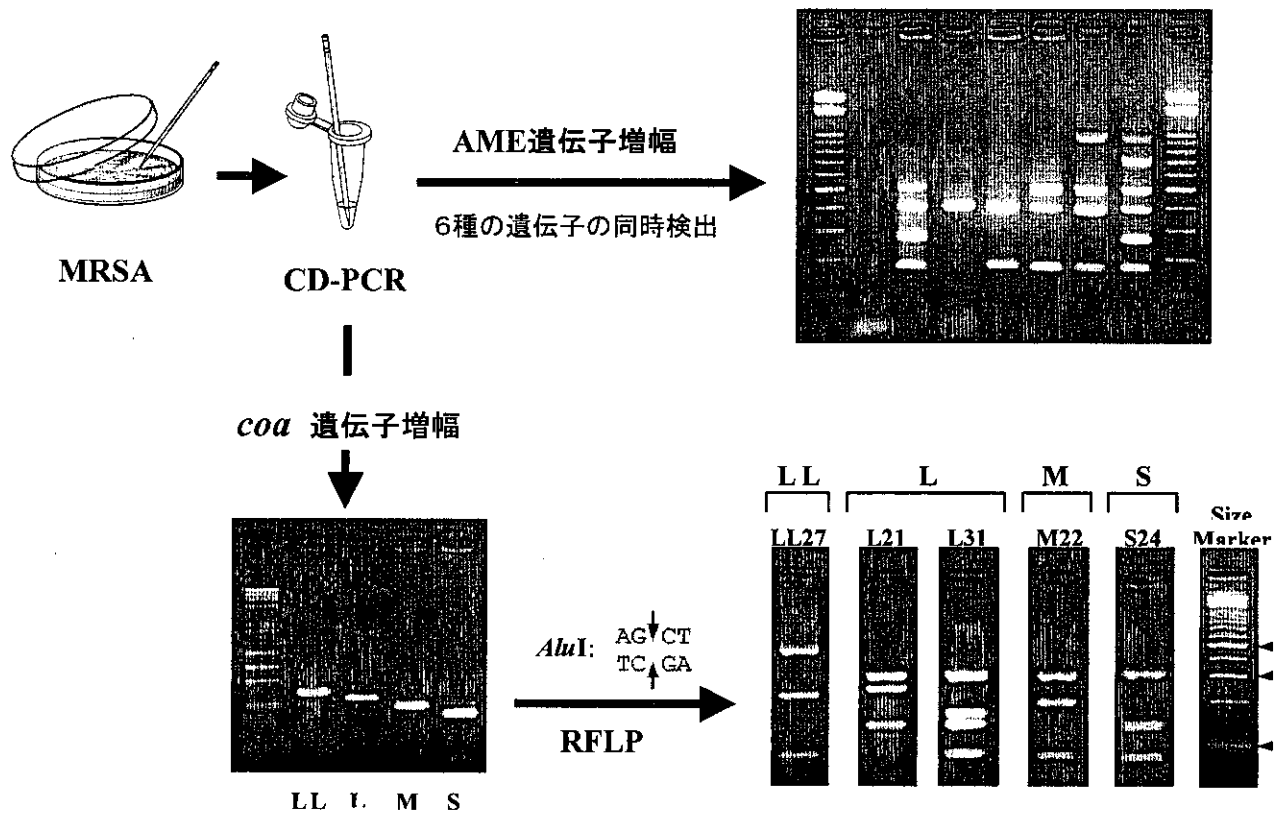


図2. Multiplex Colony Direct PCR による標的遺伝子の増幅と判別

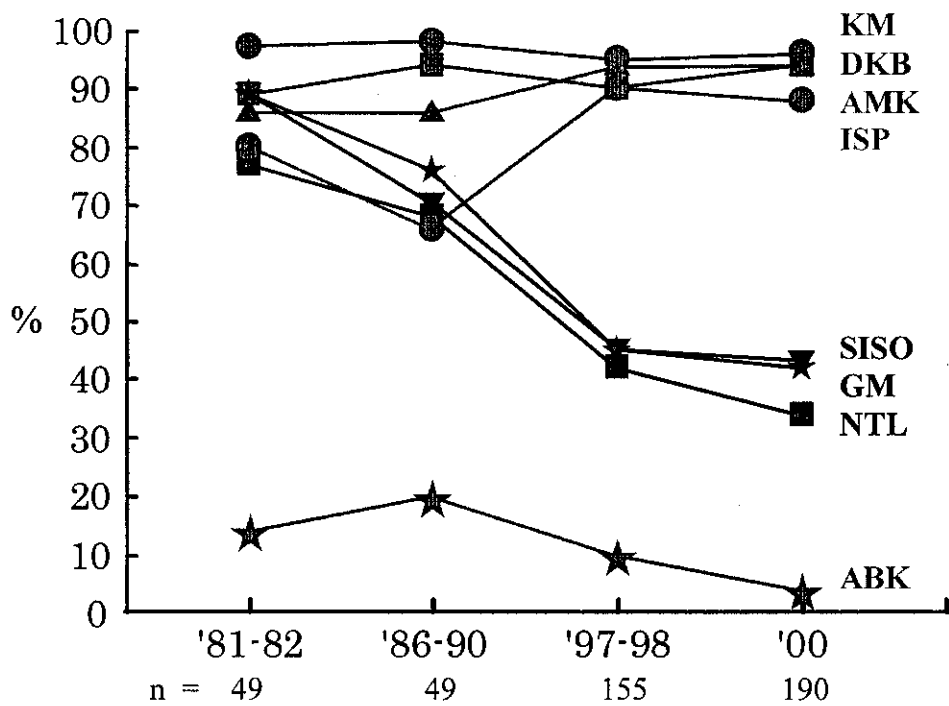


図3. AG耐性MRSA菌株の経年的変動

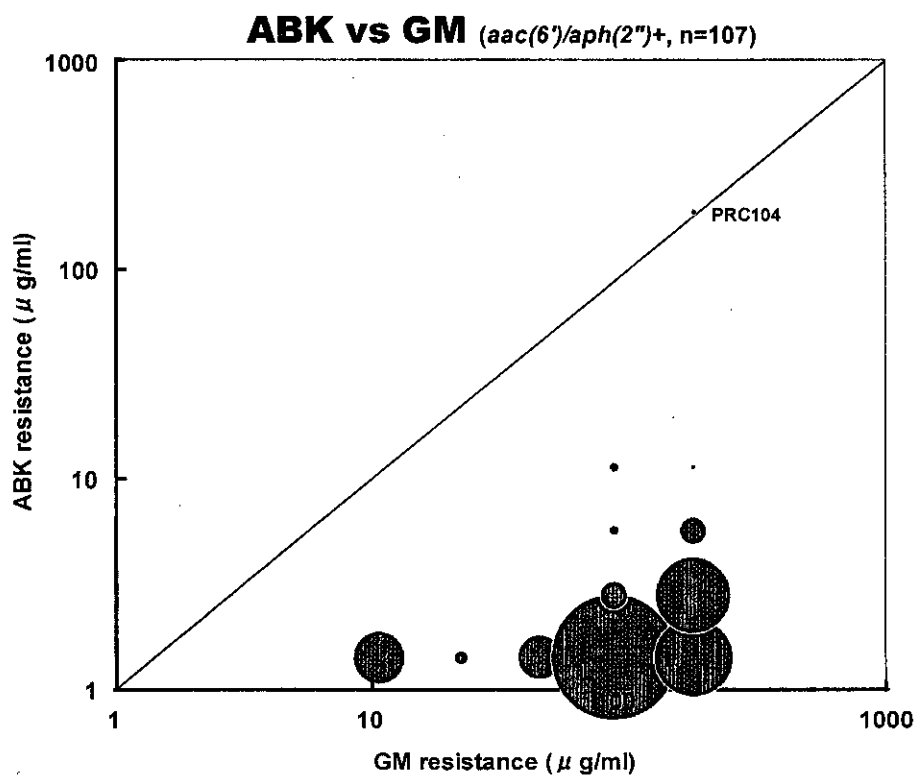


図4. *aac(6')*/*aph(2')* 単独保持MRSA菌株のGM耐性とABK耐性の対比

丸の大きさは菌株数を反映し、大きいほど数が多い

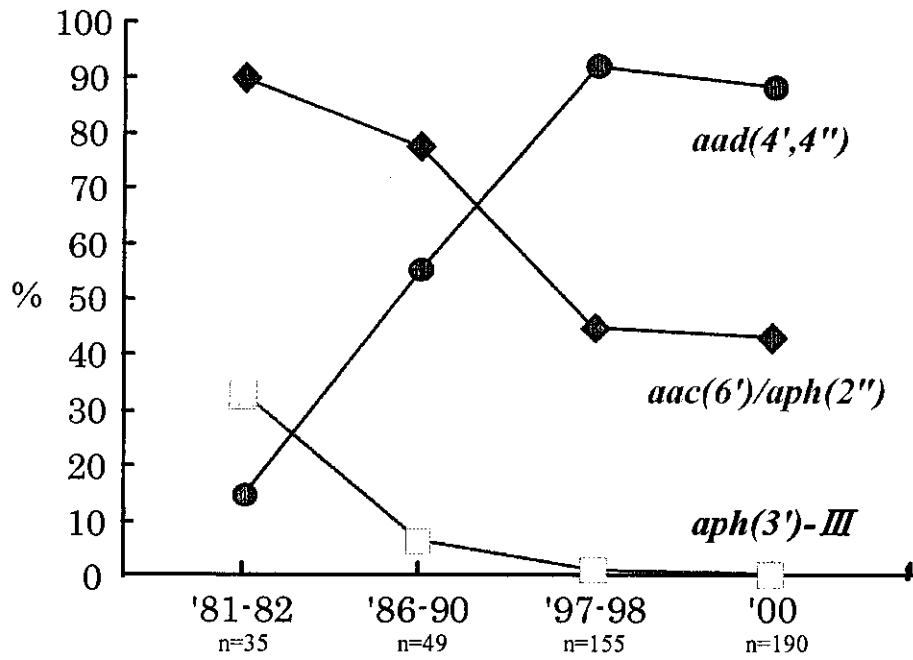


図5. AME遺伝子保持MRSA菌株の経年的推移

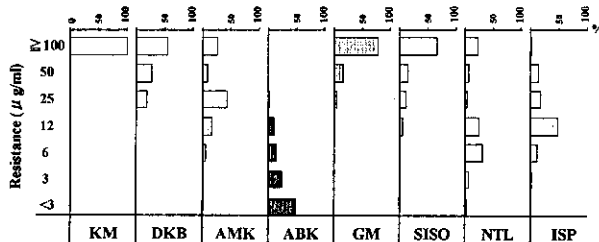
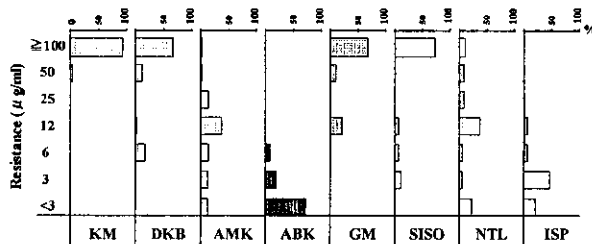
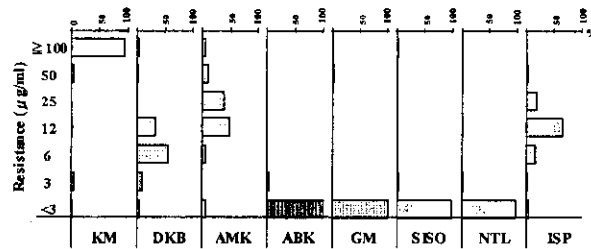
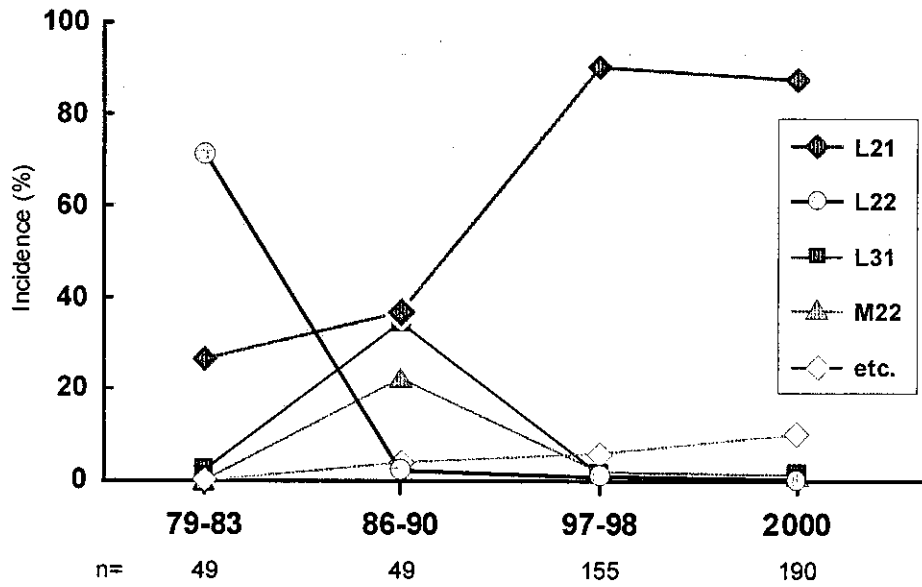


図5. AME遺伝子保持MRSA菌株のAG耐性

### A. Incidence of *coa-AIuI* RFLP type.



### B. Incidence of Enterotoxin gene profile.

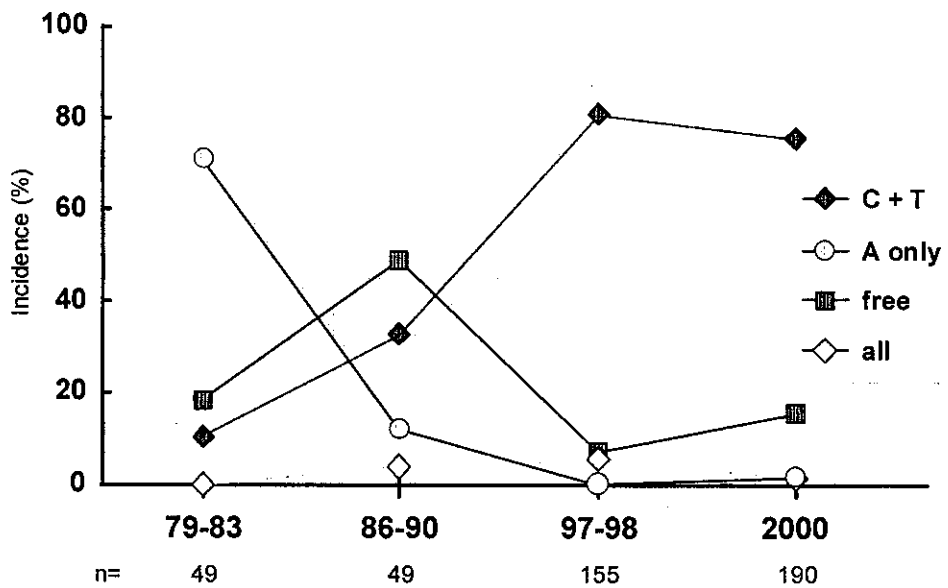


図7. コアグララーゼ遺伝子型(A)とエンテロトキシン遺伝子プロフィール(B)の経年的推移

## 多剤耐性 *Pseudomonas aeruginosa* の耐性機構に関する研究

分担研究者 山口 恵三 東邦大学医学部 教授  
研究協力者 石井 良和 東邦大学医学部 助手  
Alba Jimena 東邦大学医学部 研究生  
木村聡一郎 東邦大学医学部 研究生  
後藤 直正 京都薬科大学 助教授  
西野 武志 京都薬科大学 教授

### 研究要旨

東邦大学医学部附属大森病院検査部に提出された臨床材料から分離されたカルバペネム系およびフルオロキノロン系抗菌薬に耐性を示す *Pseudomonas aeruginosa* TUM1529 を対象に、そのカルバペネム系抗菌薬耐性機構に関して検討した。この *P. aeruginosa* TUM1529 株のイミペネムおよびメロペネムに対する MIC 値は、それぞれ 32 $\mu$ g/mL および 16 $\mu$ g/mL であった。そして、このカルバペネム系抗菌薬耐性は、クラス B 型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤の併用により改善を認めなかった。そこで、*P. aeruginosa* TUM1529 株の染色体上に存在する *ampC* を破壊したところ、イミペネムおよびメロペネムの MIC 値は、いずれも 2 $\mu$ g/mL 以下と顕著な改善を認めた。したがって、*P. aeruginosa* TUM1529 のカルバペネム耐性には染色体上に存在するセファロスポリナーゼの関与が強く示唆された。そこで、この  $\beta$ -ラクタマーゼを精製し、酵素学的パラメータを求めた。その結果、本菌株が産生する AmpC はペニシリン系、セファロスポリン系、セファマイシン系を加水分解し、さらにカルバペネム系抗菌薬をも加水分解することが明らかとなった。

### A. 研究目的

多剤耐性 *Pseudomonas aeruginosa* による感染症が発生した場合、その治療薬が存在しないことなどの理由から極めて深刻な問題となる。*P. aeruginosa* 感染は、免疫が低下した状態にあるいわゆる immunocompromized host に院内感染として発生する。近年、新潟県および神奈川県で多剤耐性 *P. aeruginosa* による院内感染が発生し大きな問題となったことは記憶に新しい。多剤耐性 *P.*

*aeruginosa* とは、カルバペネム系抗菌薬を含む  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬、アミカシンを含むアミノ配糖体系抗菌薬ならびにフルオロキノロン系抗菌薬の異なる3系統の抗菌薬に対して同時に耐性を示す *P. aeruginosa* を言う。したがって、現在市販されている抗菌薬のほとんど全てに対して耐性を示すことから、多くの場合、その治療は困難を極める。しかし、その耐性機構に関する詳細な検討は、*P. aeruginosa* の耐性因子が複雑であるこ



となどの理由から、未だ十分になされていないとはいえない。そこで今回は、多剤耐性 *P. aeruginosa* のカルバペネム系抗菌薬耐性メカニズムの解明することを目的に検討した。

一般にカルバペネム系薬耐性 *P. aeruginosa* というと、まず IMP-1 のようなクラス B 型  $\beta$ -ラクタメースの関与が考えられる。しかし、今回対象とした *P. aeruginosa* はクラス B 型酵素を産生しないことから、本菌株のカルバペネム系抗菌薬に対する耐性機序として、クラス B 型酵素以外の耐性因子が考えられる。

## B. 研究方法

供試菌株として、東邦大学医学部付属大森病院に入院中の患者の尿由来の *P. aeruginosa* TUM1529 を用いた。なお、菌種の同定は、VitekII(日本ビオメリュー、東京)を用いて行った。

薬剤感受性試験は、NCCLS が推奨する方法に準拠した微量液体希釈法にて実施した。

$\beta$ -ラクタマーゼの誘導能は、1 $\mu$ g/ml のイミペネム共存下における活性を薬剤非共存下における活性で除して求めた。なお、酵素活性は基質として GENTA 用いて、吸光光度計 UV-2550 型(島津製作所、京都)を用いて 1 分間タイムスキャンし、その吸光度の変化量を酵素活性とした。

*ampC* のノックアウト株は、定法に従って作成した。すなわち、*ampC* をクローニングした後、破壊した *ampC* を基に、*P. aeruginosa* TUM1529 の染色体上に存在する *ampC* を、相同組み換えを利用して置換した。

本菌株が産生するクラス C 型  $\beta$ -ラクタマーゼ(AmpC)は、ポロニック酸ゲル(シグマアルドリッチ、東京)を用いて精製した。精製した結果は Fig. 1 に示したが、95%以上の純度であることが確認された。



Fig. 1 Purity of AmpC from *P. aeruginosa* TUM1529 by SDS-PAGE. lane 1: molecular marker, lane 2: purified AmpC.

精製された AmpC を用いて酵素学的検討を実施した。パラメータの算出には基質としてペニシリン G ( $\Delta\epsilon_{233} = -780 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )、ニトロセフィン、セファロチン ( $\Delta\epsilon_{262} = -7660 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )、セフォキシチン ( $\Delta\epsilon_{270} = -7380 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )およびイミペネム ( $\Delta\epsilon_{278} = -5,660 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )を用い、UV 法にて測定した。なお、パラメータの算出には Hanes-Woolf plot を用いた。

## C. 研究結果

*P. aeruginosa* TUM1529 の薬剤感受性試験成績を Table 1 に示した。全ての  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬に耐性を示した。この中で、イミペネム(32 $\mu$ g/mL)およびセフトジジム(64 $\mu$ g/mL)に対する感受性はキレート剤の添加によって改善しなかった。このことから、クラス B に属する  $\beta$ -ラク

タマーゼの関与は否定された。さらに、メロペナムに対する MIC 値は 8 $\mu$ g/mL であり、NCCLS の基準によると耐性と判断された。さらに、フルオロキノロン系抗菌薬であるレボフロキサシンに対する MIC 値は 32 $\mu$ g/mL であり耐性と判定された。幸運にも本菌株のアミカシンに対する MIC 値は 16 $\mu$ g/mL であり、感性と判定された。

Table 1. Antibiotic susceptibility of *P. aeruginosa* TUM1529

Antibiotics	
Piperacillin	>128
Cefoxitin	>32
Cefotiam	>32
Ceftazidime	32
Ceftazidime/Clavulanic acid	32/4
Cefotaxime	>128
Cefotaxime/Clavulanic acid	>32/4
Ceftizoxime	>64
Aztreonam	16
Imipenem	32
Meropenem	8
Amikacin	16
Levofloxacin	32

本菌株の  $\beta$ -ラクタマーゼを 1mg/mL のイミペナムで誘導してその酵素活性を非誘導時の活性と比較した。その結果、*P. aeruginosa* TUM1529 が産生する AmpC は誘導効率の高い酵素であることが明らかとなった (Table 2)。すなわち、本菌株は脱抑制型の AmpC ではないことがと考えられる。さらに、本  $\beta$ -ラクタマーゼの粗酵素は CENTA をよく加水分解するが、イミペナムはほとんど分解しないことが確認された。ただ、誘導時の酵素にイミペナム分解活性が若干認められた。

Table 2. Inducibility of  $\beta$ -lactamase from *P. aeruginosa* TUM1529

Induction	CENTA		Imipenem	
	Activity	Specific activity*	Activity	Specific activity*
-	0.20	0.06	<0.01	<0.01
+	0.55	0.40 (7)**	0.02	0.01(11.0)**

\*: specific activity = activity/mg of protein  
 \*\*: induction ratio = uninduced activity/induced activity

次に本菌株の染色体上に存在する、クラス C 型  $\beta$ -ラクタマーゼを破壊した菌株の薬剤感受性を測定し先のデータと比較検討した。その結果、AmpC ノックアウト株において、全ての  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬に対する感受性の改善が認められた (Table 3)。特にカルバペナム系抗菌薬においてノックアウト株の MIC 値の顕著な低下が認められた。

Table 3. Antibiotic susceptibility of AmpC disrupted *P. aeruginosa* TUM1529

Antibiotic	1529	1529 <sup>*</sup>
Ceftizoxime	>256	64
Cefepime	256	82
Ceftazidime	32	<2
Cefotaxime	256	32
Ceftiofime	16	4
Imipenem	32	<2
Meropenem	16	<2
Biapenem	32	<2
Tobramycin	<2	<2

1529<sup>\*</sup>: AmpC knockout strain from 1529

以上の結果は、クラス C  $\beta$ -ラクタマーゼの関与を強く示唆するものであり、次に酵素学的検討を実施した。その結果は、Table 4 に示した。*P. aeruginosa* TUM1529 が産生する AmpC は、ペニシリン系、セファロスポリン系、セファマイシン系およびカルバペナム系抗菌薬を全て分解した。特にカルバペナム系抗菌薬に対する酵素学的パラメータはセファマイシン系抗菌薬と同程度であり、 $k_{cat}/K_m$  値は 0.10 $\mu$ M<sup>-1</sup>・s<sup>-1</sup>であった。

Table 4. Kinetic parameter of AmpC from *P. aeruginosa* TUM1529 strain

	$K_m$ or $K_i$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (s <sup>-1</sup> $\mu$ M <sup>-1</sup> )
Penicillin G	8.69	142	16.3
Nitrocefin	73.5	241	3.28
Cephalothin	169	318	1.88
Cefoxitin	2.16*	0.18	0.08
Imipenem	52.0*	5.16	0.10

\*:  $K_i$  value

#### D. 考察

*P. aeruginosa* TUM1529 は、厳密に言

えば多剤耐性 *P. aeruginosa* ではない。すなわち、*P. aeruginosa* TUM1529 は、アミカシンに感受性を示すからである。しかし、この菌株はイミペネムおよびメロペネムを含むカルバペネム系抗菌薬耐性に耐性を示すことから、OprD の関与によるカルバペネム耐性であることは否定された。さらに、クラス B 型  $\beta$ -ラクタマーゼによるカルバペネム系抗菌薬耐性による可能性は、SMA ディスクによる阻止円径の拡張が認められなかったことから否定された。データは示さなかったが、*P. aeruginosa* TUM1529 の排出ポンプのいくつかは大量発現されている。しかし、排出ポンプのみでカルバペネム系抗菌薬の MIC 値がこれほど上昇することはないと考えられている。したがって、染色体性  $\beta$ -ラクタマーゼ(AmpC)の発現量の関与が考えられるが、本菌株の非誘導時における  $\beta$ -ラクタマーゼの発現量が特に多いようなデータも得られなかった。以上の背景から、現在までに知られている以外の耐性機構が存在するものと考えた。

まず、本菌株の染色体性  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子(*ampC*)を破壊した菌株に対するカルバペネム系抗菌薬を含む全ての  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の MIC 値が改善したことから、カルバペネム系抗菌薬に対する耐性に AmpC が何らかの関与をしていることが示唆された。すなわち、1) この AmpC がカルバペネム系抗菌薬を直接分解している可能性と、2)ペリプラスミック空間に大量に存在する AmpC がカルバペネム系抗菌薬と結合してその作用点である PBP への到達を障害して

いる可能性である。一般に PBP への到達障害により耐性を獲得される薬剤として、第 2 世代、第 3 世代および第 4 世代セフェム系抗菌薬が知られている。しかし、カルバペネム系抗菌薬に関しても若干の MIC 値の上昇についての報告はあるが、*P. aeruginosa* TUM1529 のように高い値は示さない。以上のことから、*P. aeruginosa* TUM1529 のカルバペネム系抗菌薬耐性は、AmpC の量的な変化というより、質的な変化があることが強く示唆された。そこで、*P. aeruginosa* TUM1529 由来の精製された AmpC を使って Kinetic parameter の算出ならびにその解析を試みた。その結果、本酵素は、ペニシリン系、セファロスポリン系、セファマイシン系およびカルバペネム系多くの  $\beta$ -ラクタマーゼを分解することが明らかとなった。そして、カルバペネム系抗菌薬の分解速度は、 $5.16 \text{ s}^{-1}$  であり、セフォキシチンの  $0.18 \text{ s}^{-1}$  より高い値を示した。カルバペネム系抗菌薬を分解するクラス A およびクラス D 型酵素は報告されているが、カルバペネム系抗菌薬を分解するクラス C 型  $\beta$ -ラクタマーゼに関する報告はなく、今回の報告が初めてである。今後は、これらのカルバペネム分解型  $\beta$ -ラクタマーゼを産生する多剤耐性 *P. aeruginosa* による感染症が発生した場合の臨床における対応方法の確立など現実に即した形での研究が求められると考えている。

#### E. 結語

*P. aeruginosa* TUM1529 株の染色体上に存在する *ampC* を破壊したところ、イミペネムおよびメロペネムの MIC 値は、そ

れぞれ 32 $\mu$ g/mL あるいは 16 $\mu$ g/mL であったものが 2 $\mu$ g/mL 以下まで顕著な改善を認めた。したがって、*P. aeruginosa* TUM1529 のカルバペネム耐性には染色体上に存在するセファロスポリナーゼの関与が強く示唆された。次に、*P. aeruginosa* TUM1529 が産生する AmpC を精製し、酵素学的パラメータを求めたところ、この酵素はペニシリン系、セファロスポリン系、セファマイシン系およびカルバペネム系抗菌薬を加水分解することが明らかとなった。今回の報告は、カルバペネム系抗菌薬を分解する AmpC に関する最初の報告であり、このような  $\beta$ -ラクタマーゼを産生する *P. aeruginosa* の動向に注意を払う必要があると考えられた。

#### E. 学会発表

- 1) 石井良和、Alba Jimena、木村聡一郎、後藤直正、西野武志、山口恵三. 多剤耐性 *Pseudomonas aeruginosa* のカルバペネム系薬耐性機構に関する検討. 2002. 10月31日、11月1日. 第51回日本感染症学会東日本地方会総会・第49回日本化学療法学会東日本支部総会. 仙台
- 2) 石井良和. 緑膿菌の薬剤耐性機構 - AmpC - 2003年. 1月25日. 第37回緑膿菌感染症研究会. 那覇

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

分担研究報告書

臨床分離フルオロキノロン高度耐性菌の耐性遺伝子の解析

およびキノロン感受性に影響を与える因子に関する研究

分担研究者：千葉大学大学院薬学研究院 山本 友子

## 研究要旨

昨年度我々が行った臨床分離株（グラム陽性菌 331 株、陰性菌 430 株）のフルオロキノロン耐性調査において、著しい高度耐性化が認められた *Proteus mirabilis* と *Pseudomonas aeruginosa* について、耐性遺伝子の検討を行った。*P. mirabilis* の LVFX に対する MIC が 2 $\mu$ g/ml 以上を示すすべての耐性菌において、標的酵素である GyrA の変異 (Ser83Ile まれに Glu87Lys) と ParC の変異 (Ser80Arg or Ileu) が認められた。一方、MIC が 128-1024 $\mu$ g/ml を示す高度耐性菌においては、GyrA, ParC の変異に加えて GyrB の変異 (Ser462Tyr) が共通に認められたことから、他の近縁菌種と異なり *P. mirabilis* のフルオロキノロン高度耐性には GyrB の変異が寄与する可能性が示唆された。*P. aeruginosa* 34 株の耐性菌において、GyrA の変異 (Thr83Ile まれに Asp87Asn) と ParC の変異 (主に Ser87Leu) が認められた。さらに分離株の 66.6% において薬剤排出ポンプが耐性に寄与していることが明らかとなった。フルオロキノロンの抗菌活性に影響を与える因子を検討した結果、Lon プロテアーゼが同定された。

## A. 研究目的

フルオロキノロンは、臨床において最も繁用されている抗菌薬のひとつであるが、近年多くの菌種が耐性化の傾向にあり、又高度耐性菌の出現が危惧されているところである。昨年度我々が行った臨床分離株（グラム陽性菌 331 株、陰性菌 430 株）のフルオロキノロン耐性の調査結果は、*P. aeruginosa* (32%)、*S. aureus* (70%)、*S. epidermidis* (45%)、*E. faecalis* (31%) で耐性菌が増加していることを示していた。さらに *P. aeruginosa* は Levofloxacin (LVFX) に対する MIC 64  $\mu$ g/ml~512  $\mu$ g/ml を示す高度耐性菌が全体の 73% を占めていたことから、かなりのスピードで高度耐性化していると考えられた。さらに *P. mirabilis* に MIC 1024  $\mu$ g/ml を示す超高度耐性菌が存在した。これら臨床分離株のキノロン高度耐性メカニズムを解明するために、薬剤の標的酵素である DNA gyrase および Topoisomerase IV の遺伝子の解析を行った。キノロン耐性の主なメカニズムとして、標的酵素の変異に加え、透過性の低下や薬剤排出の亢進等が報告されている。そこで *P. aeruginosa* 高度耐性菌に関しては、薬剤排出による耐性化の可能性を併せて検討した。

細菌の薬剤感受性に影響を与える因子を同定するため、昨年度に引き続き、抗菌剤に曝露された大腸菌のプロテオミクスを行い、フルオロキノロンの抗菌活性に影響を与える細菌因子を同定し、その作用機序の解明を試みた。

## B. 方法

キノロン標的酵素として知られている DNA gyrase と topoisomerase IV のそれぞれ遺伝子である *gyrA*, *gyrB* と *parC* のキノロン耐性決定領域 QRDR を含む DNA を PCR により増幅し、塩基配列を解析することにより標的酵素の変異を検出した。

種々の濃度の LVFX に暴露した大腸菌を <sup>35</sup>S—メチオニンで標識し、溶菌液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動あるいは2次元ゲル電気泳動により展開後、蛋白スポットを MALDI-TOF Mass を用いて質量解析し、Protein Database (ProFound) による同定を行った。

## C. 結果と考察

### (1) フルオロキノロン高度耐性プロテウスの耐性遺伝子の解析

フルオロキノロンは尿路感染症において最も高頻度で使用されていることから、尿路より分離された多くの菌種で耐性菌が認められる。腸内細菌の種々の菌種において、GyrA および ParC の変異と耐性の関連が報告されてきた。しかしながら、尿路より比較的高頻度に分離される *P.mirabilis* に関しては本研究開始時において報告がなかったことから、昨年度の疫学調査で分離された *P.mirabilis* フルオロキノロン高度耐性株の DNA gyrase 遺伝子 *gyrA*, *gyrB* および Topoisomerase IV 遺伝子 *parC*, *parE* について解析を行った。その結果 LVFX に対する MIC が 2μg/ml 以上を示すすべての耐性菌において、GyrA の変異 (Ser83Ile まれに Glu87Lys) と ParC の変異 (Ser80Arg or Ileu) が認められた。一方、MIC が 128-1024μg/ml を示す高度耐性菌においては、GyrA, ParC の変異に加えて GyrB の変異 (Ser462Tyr) が共通に認められたことから、他の近縁菌種と異なり *P.mirabilis* のフルオロキノロン高度耐性には GyrB の変異が寄与する可能性が示唆された。同様の結果が、2002年8月に報告された (AAC 46:2582) ことから、*P.mirabilis* においてはフルオロキノロン高度耐性をもたらす *gyrB* の変異が比較的高い頻度で起こっていると考えられる。

### (2) 緑膿菌のフルオロキノロン高度耐性メカニズムの解析

LVFX に対する MIC が 8-512μg/ml の *P.aeruginosa* 34 株について、*gyrA*, *gyrB*, *parC* の QRDRs を解析した。すべての耐性菌において、GyrA の変異 (Thr83Ile まれに Asp87Asn) と ParC の変異 (主に Ser87Leu) が認められた。一方 *gyrB* 塩基配列には数多くの変異が認められたが、いずれ

もサイレント変異であった。*P.aeruginosa* の排出ポンプ非特異的阻害剤である $\beta$ -Naphthylamineを用いて、排出亢進による耐性化の可能性を検討した結果、分離株の 66.6%において阻害剤によるLVFX耐性低下が認められた(表1)。阻害剤の効果はMIC32 $\mu$ g/ml以上の耐性菌に集中して認められたが、一方ではMIC128-512 $\mu$ g/mlの高度耐性菌の中に阻害剤の影響を全く受けない菌株も存在した。

### (3) フルオロキノロン感受性に影響を与える因子に関する研究

昨年度は、LVFXに曝露された大腸菌のプロテオーム解析を行い、ストレス蛋白質が誘発される事を明らかにした。今年度はこの誘発のメカニズムを検討したところ、LVFXによりストレス応答の正の制御因子シグマ32が誘発される事、さらに細胞内に凝集蛋白質が蓄積する事が明らかとなった。従ってLVFXにより細胞内に過剰に蓄積した凝集蛋白質がDnaKシャペロンを消費することにより、DnaKによるシグマ32の活性抑制が解除されストレス応答が誘発されると考えられる。又、最も優位に誘発される蛋白質は主に、膜表面に存在する蛋白画分に含まれ、1M NaClによって溶解される不溶性蛋白質であったが、これを質量分析により同定を試みたところ、RecA蛋白質であることが明らかとなった。RecAはSOS応答により誘発される細胞質生の蛋白質であるが、過剰に誘発され凝集したと考えられた(図1)。当研究室保存のストレス遺伝子変異株ライブラリーを用いて、キノロン感受性に影響を与える因子を検索した結果、Lonプロテアーゼの効果を見いだした。すなわち、Lon欠損により大腸菌のキノロン感受性が顕著に増加する事(図2)、又この効果はGyrA, ParC変異による耐性菌においても現れる事を明らかにした。Lonは、細胞分裂の負の制御因子SulA蛋白質の分解制御に関わっている。そこで、Lon変異によるキノロン感受性化のメカニズムを解明するために、*sulA*変異を導入して、キノロン感受性を検討した。その結果、感受性化はLon変異とキノロンによるSOS応答の連続的な誘発を介したSulAの異常蓄積による事が明らかとなった。本研究結果は、Lon活性阻害剤がフルオロキノロンの有効な併用剤となる可能性を示唆している。

#### D. 研究発表

山口優子、友安俊文、高屋明子、山本友子

大腸菌のストレス応答プロテアーゼ、Lon欠損によるフルオロキノロン感受性の変化 第76

回日本細菌学会総会

山口優子、友安俊文、高屋明子、山本友子

大腸菌のAAA+プロテアーゼ、Lon欠損によるキノロン感受性の変化

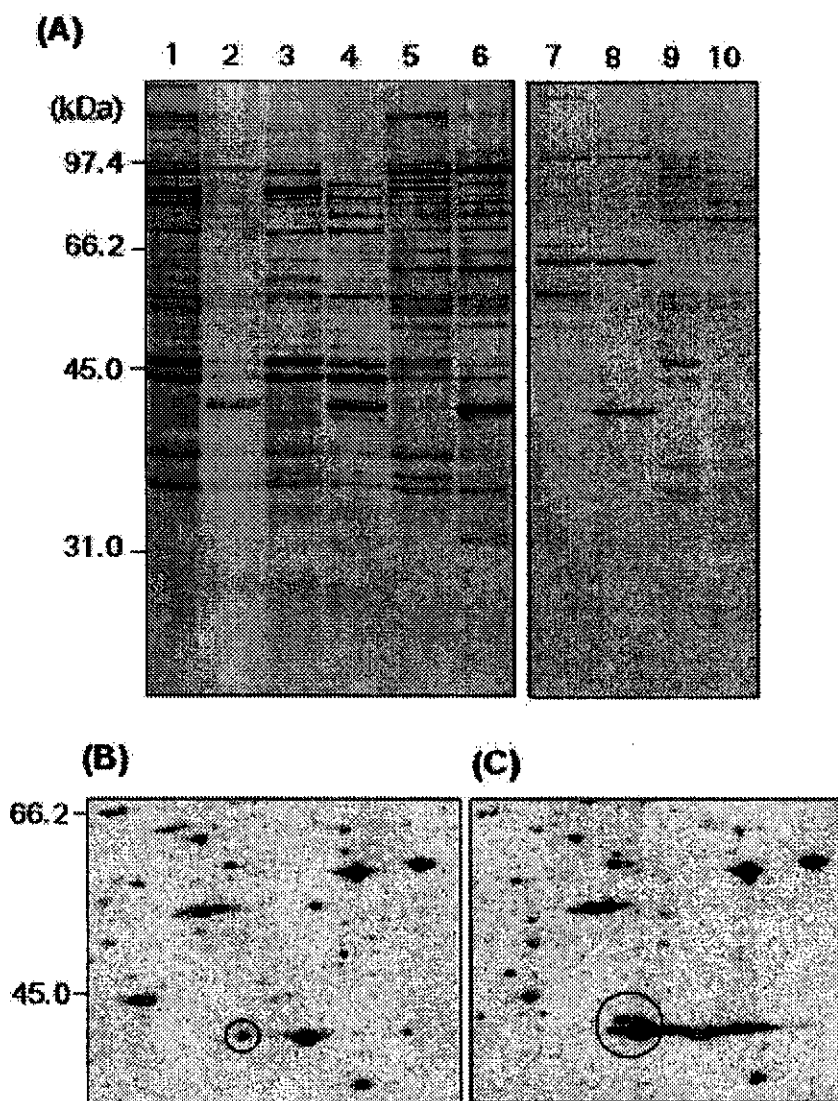
第85回日本細菌学会関東支部総会

表1 Effect of multidrug resistance efflux inhibitor, betaNaphthylamine\*,  
on LVFX resistance of clinical isolates of *P. aeruginosa*

LVFX MIC	LVFX MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) in the presence of beta-Naphthylamine									
	0	2	4	8	16	32	64	128	256	512
0										
2										
4										
8		6	2							
16				1						
32		3	4		1	1				
64		2	3	1	1	1	1			
128				1	1	1	2	4		
256										
512						1				1

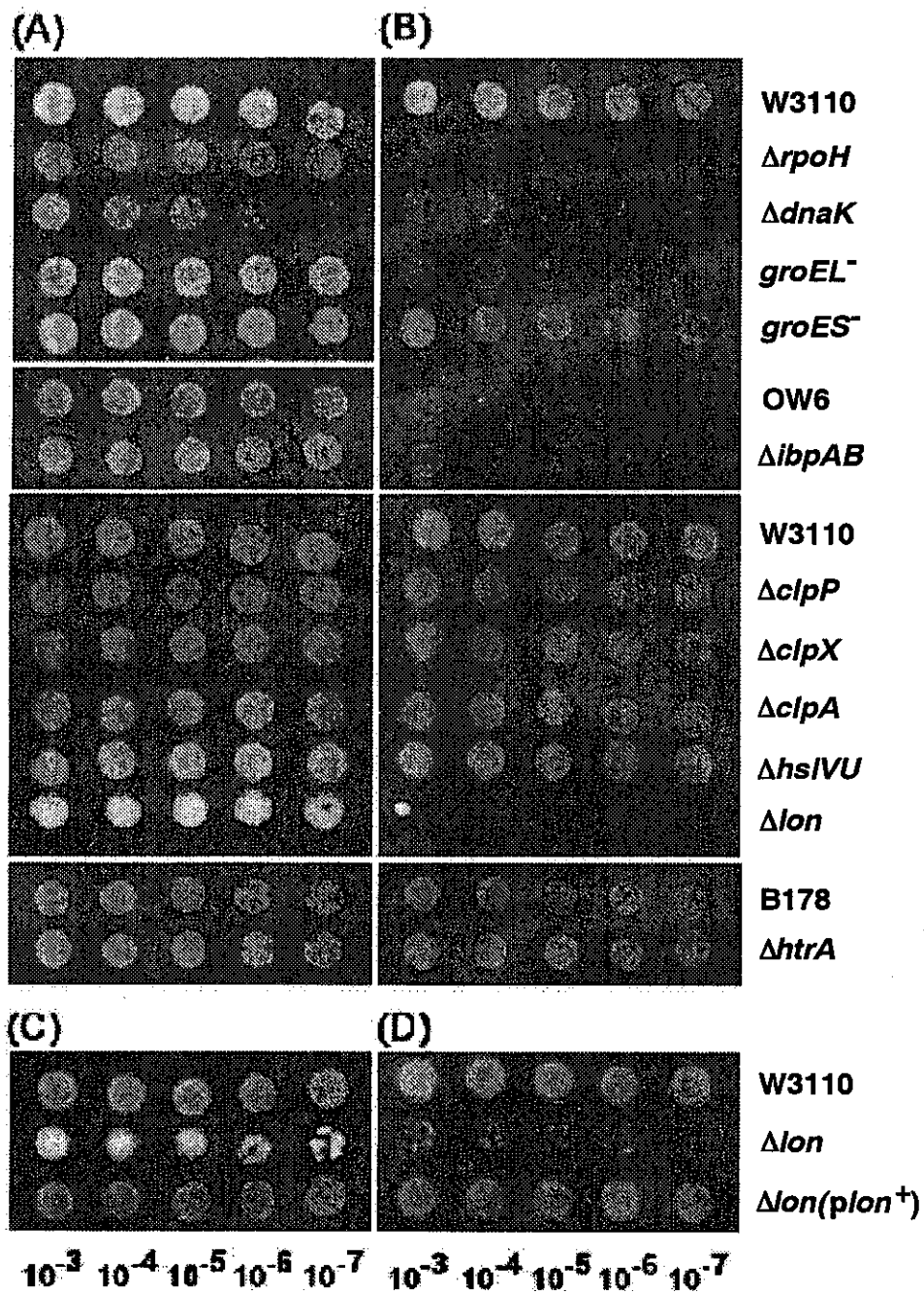
40  $\mu\text{g/ml}$  (MIC: >512  $\mu\text{g/ml}$ )





**Fig.1. Fractionation of proteins synthesized in *E.coli* exposed to LVFX**

The proteins from cells which had been pulse-labeled for 1 min after incubation with 10  $\mu\text{g/ml}$  of LVFX for 10 min were fractionated and separated by SDS-PAGE (A). The protein samples from untreated cells were run in lanes 1, 3, 5, 7 and 9. The samples from LVFX-treated cells were in lanes 2, 4, 6, 8 and 10. Lanes contain protein fractions as follows: lanes 1 and 2, whole cell lysates; lanes 3 and 4, cytoplasmic and periplasmic protein fractions, lane 5 and 6, membrane-associated protein fractions. The membrane-associated proteins were solubilized in 1 M NaCl and then dialyzed. After centrifugation, the pellets were solubilized in lysis buffer and applied in lanes 7 and 8. The supernatants were applied in lanes 9 and 10. Aliquots of protein samples that had been applied in lanes 7 and 8 were subjected to the two-dimensional gel electrophoresis and shown in (B) and (C), respectively.



**Fig.2. Susceptibility of chaperone- or protease-deficient mutants to LVFX**  
 Bacterial cultures were diluted from  $10^3$  to  $10^{-7}$  and then spotted on to the agar plates prepared by the standard agar doubling dilution methods. (A) and (C) are results with the drug-free agar plates. (B) and (D) are results with the agar plates containing 0.0125 g/ml of LVFX. Abbreviation: *plon+*, a complementing plasmid carrying intact *lon* gene.

グリコペプチド耐性黄色ブドウ球菌の検出法と耐性遺伝子検査技術の開発  
 —テイコプラニン感受性に影響を与える因子の解析—  
 (平成 14 年度要旨)

分担研究者 和田昭仁 国立感染症研究所 細菌第一部

テイコプラニン耐性株 BB938 に感受性株 BB255 の染色体の一部を導入した感受性株の解析より、テイコプラニン感受性に影響を与える因子は染色体 *Sma*I-E 断片上に存在することが示された。耐性株と感受性株では、*Clostridium* の転写調節因子と相同性を示す *orf1* に 1 塩基の相違が見られた。*orf1* を破壊することにより BB938 はテイコプラニン感受性になり、これを相補することにより、耐性が回復した。*orf1* 破壊株では 45 kD 蛋白の発現増加が見られ、*orf1* の産物は、直接にまたは間接にこの蛋白の発現を抑制していると考えられた。グリコペプチド感受性に直接的に影響を与える因子の発見にはより詳細な蛋白解析が必要である。

A. 研究目的

2002 年、アメリカで *vanA* を持つ MRSA の臨床分離例が 2 例報告され、本邦でも、バンコマイシン耐性 MRSA の分離が強く懸念される事態となっている。*vanA* 保持 MRSA はバンコマイシンに対して 32 µg/ml 以上の MIC を示すが、*vanA* を持たない臨床分離黄色ブドウ球菌は、少数の株を除き、そのバンコマイシンの MIC は 4 µg/ml が最高である。このバンコマイシン低感受性発現には複数の遺伝子の変異が必要でると考えられているが、その表現型は不安定で、遺伝的解析の障害となっている。バンコマイシンと同系統の薬剤であるテイコプラニンに対する耐性は、これと比べ安定であり、また、耐性菌においては 32 µg/ml 程度までの MIC の上昇が見られるため、この薬剤はグリコペプチド感受性に影響を与える因子の解析対象としての利点をもっている。過去 2 年間の研究により、*tcaRAB*

*sigB* がテイコプラニン感受性に影響をあたえることが示された。本年度の研究では、感受性に影響を与えるこれ以外の因子の遺伝学的解析をおこなった。

B. 方法

菌株ならびにプラスミド  
 もちいた菌株を表 1 に、プラスミドを表 2 に示す。

表 1 Characteristics of *S. aureus* strains

Strain	Remarks
BB255	NCTC8325, penicillinase plasmid cured
BB938	BB255 transformant with genomic DNAs of a teicoplanin-resistant <i>S. aureus</i> strain
BB938D	BB938 <i>orf1::aac-aph</i>

表 2 Characteristics of plasmids used

plasmid	characteristics
pAW18	<i>S. aureus</i> - <i>E. coli</i> shuttle vecor, <i>ermAM</i>
pAW19.2	suicide vector for <i>S. aureus</i> , <i>tetL</i>

p18-Tc	pAW18, <i>Clal</i> - <i>Clal</i> fragment with <i>orf1</i> and <i>orf2</i>
p18-TcE	pAW18, <i>Clal</i> - <i>Clal</i> fragment with <i>orf2</i>
p18-TcN	pAW18, <i>Clal</i> - <i>Clal</i> fragment with <i>orf1</i>

#### 感受性測定

Etest (ABiodisk) をもちい、Em 10 µg/ml 含有 BHI(Difco)培地上に McFarland 0.5 の菌液を塗布、35 °C で 18 時間培養後の値を判定した。

#### SDS-PAGE

10% NuPAGE ゲル(Invitrogen)を用いて還元条件下で SDS-PAGE を行ったのち、クマジー染色をおこなった。

#### DNA 塩基配列決定

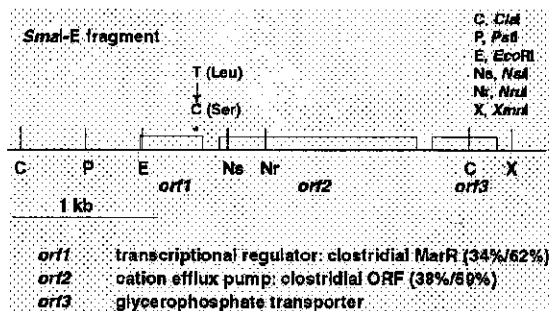
BigDye v2.0 による DyeTerminator 法でラベリングを行った後、377, 310, 3100-Avant オートシクエンサー(Applied Biosystems)にて解析をおこなった。

### C. 結果

前年度までの班研究成果により、テイコプラニン耐性株 BB938 に感受性株の BB255 染色体の一部を導入した株では、その耐性を失っていることが確認されている。これは、感受性型優位であるため、BB938 に導入された染色体上には、感受性型で働き、耐性型ではその機能が落ちているリプレッサーがのっている事が予想された。パルスフィールドゲル電気泳動により、染色体 *Sma*I-E 断片の一部が BB938 に導入されていることがわかったため、この断片を含むと考えられる約 80 kb の染色体領域の塩基配列を BB938 よ

り決定し、データベース上の NCTC8325 株 (BB255 の親株、テイコプラニン感受性) の配列と比較した。その結果、*Clostridium* の薬剤排泄ポンプの発現調節因子 MarR と 62% のアミノ酸相同性があるリーディングフレーム *orf1* 上に一塩基置換(T->C)が見られ、これにより Leu から Ser へのアミノ酸置換が起こっていた。このリーディングフレームの下流には、さらに 2 つのリーディングフレーム *orf2*, *orf3* があり、ともに陽イオンのトランスポーターとの相同性が見られた (図 1)。

図 1



次に、実際に、この *orf1* がテイコプラニンに対する感受性に影響を与えているかどうかを調べる目的で、自殺ベクター pAW19.2 をもちい、BB938 の *orf1* 中の *Eco*RI サイト (図 1) に、Km, Gm に対する耐性を与える *aph*-*aac* 遺伝子を挿入し、このリーディングフレームを破壊した株 BB938D を作成した。この株のテイコプラニンに対する感受性を測定したところ、MIC は 8 µg/ml から 3 µg/ml に低下していた。相補実験を行う目的で、*orf1* と *orf2* を含む 3.1 kb *Clal*-*Clal* 断片をシヤトルベクター pAW18 にクローニングし p18-Tc を得、ここから *orf1* 中の *Eco*RI サイトを破壊し、*orf1* のフレームを除い