

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）
分担研究報告書

グラム陽性菌の新型耐性機構に関する研究

研究分担者 山本 友子 （千葉大学・大学院薬学研究院・教授）
研究協力者 高屋 明子 （千葉大学・大学院薬学研究院・准教授）
佐藤 慶治 （千葉大学・大学院薬学研究院・助教）

研究要旨.

昨年度の肺炎球菌のテリスロマイシン耐性機構に関する研究成果を基に、さらに詳細な分子生物学的、生化学的研究を行い、新型耐性機構すなわち肺炎球菌の内因性 rRNA メチル化酵素の欠損がテリスロマイシン耐性を引き起こすことを明らかにした。本研究は肺炎球菌ケトライド高度耐性菌出現の予知情報提供に貢献すると期待できた。一方、リネゾリドは日本ではじめて承認された VRE 感染症薬、4 番目の抗 MRSA 薬である。欧米ではすでに高度耐性を含む耐性菌の分離が報告されていることから我が国での出現と増加が懸念されている。本研究では、国内の臨床におけるリネゾリド耐性化の現況ならびに耐性機構を明らかにした。

A. 研究目的

呼吸器感染症の主要な起因菌である肺炎球菌の多剤耐性化が進行し、なかでも繁用されるマクロライド系抗菌薬に対する高度耐性化が深刻な問題となっている。テリスロマイシン (TEL) はマクロライド高度耐性菌にも有効なケトライド系抗菌薬で、マクロライド耐性肺炎球菌性肺炎の治療に使用されてきたが、既に欧米では TEL 低感受性肺炎球菌の増加と高度耐性菌が報告されている。一方、リネゾリド(LZD)は日本ではじめて承認された VRE 感染症薬 (2001 年)、4 番目の抗 MRSA 薬 (2007 年) である。欧米ではすでに高度耐性を含む耐性菌の分離が報告されていることから我が国での出現と増加が懸念されている。これらの耐性菌の増加を防止する為に調査と監視を継続しつつ、さらに実効ある対策を講じる事が急務となっている。本研究では、肺炎球菌の TEL 耐性化と広範なグラム陽性菌の LZD 耐性化の現況を明らかにし、新型耐性機構と耐性因子の伝播機構の解明をめざす。

B. 研究方法

1. MIC (最小発育阻止濃度) については

CLSI 法に準じて測定した。培地は血液寒天培地(ミューラーヒントン寒天培地 + 5%馬脱繊維血) を用い、37 °C、5% CO₂ 存在下で培養した。

2. 薬剤：TEL は、ケテック錠 (サノフィ・アベンティス) から抽出後、再結晶化した。構造は C-13NMR により確認し、力価は、ATCC29213 株を用いて MIC 測定とディスク拡散法によって評価した LZD は Pfizer より提供された。その他の薬剤は市販のものを用いた。
3. PCR, DNA 塩基配列決定は定法に従った。
4. Primer extension 法による rRNA メチル化の検討は、我々の確立した方法を用いた (Antimicrob. Agents Chemother. 2013, 57:3789-3796)。

倫理面への配慮

本研究で得られる菌株は、分離した医療機関において、連結可能匿名化することにより、研究者に患者の特定ができないよう配慮した。また、研究成果の発表にあたっては、患者の氏名などは一切公表しないこととする。

C. 研究結果

(1)肺炎球菌のテリスロマイシン耐性

先行した昨年度の研究により肺炎球菌において内因性 23S rRNA 修飾酵素 RImA^{II} による 748 位のグアニン(G748)のメチル化がケトライド系抗菌薬テリスロマイシン(TEL)の抗菌活性に深く関与することを見出した(Takaya et al., 2013, AAC 57: 3789-3796)。G748 は TEL が結合する Hairpin35 領域に存在する。そこで今年度は G748 に隣接する Hairpin35 内の U747 のメチル化の役割について検討した。まず肺炎球菌 U747 のメチル化及びその修飾酵素を同定するため *E. coli* U747 修飾酵素 RImC のホモログを探索した。その結果、SP_1029、SP_1901 を得た。野生株及び各欠損株の rRNA を抽出し LC-MS/MS により解析したところ、SP_1029 欠損株で U747 のメチル化が消失していた。このことから、肺炎球菌 23S rRNA の U747 は SP_1029 にコードされる RImCD によってメチル化されることが明らかとなった。RImCD 欠損株の TEL の MIC を測定したところ、RImCD⁺株に対し 2 段階上昇した。RImCD 欠損株での MIC 上昇に G748 修飾が関与する可能性について Primer Extension 法を行った結果、RImCD 欠損株の G748 修飾は野生株に比べ減少していた。また、RImCD 欠損株へ野生型 RImA^{II} を導入して MIC を測定したところ RImCD⁺株と同じ値を示した。

(2)ブドウ球菌のリネゾリド耐性

2014 年に国内の 1 臨床機関において分離された 6 株の LZD 耐性 coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) について耐性関連因子を解析した(表 1)。

耐性菌は主に 2576 位の G が U に変異していた。計算生物学的手法により、rRNA-LZD 結合のモデリングを行った結果、G2576 は、G2576-U2576-LZD ネットワークを形成するが、G2576U の変異により結合ネットワークが形成されず、LZD の rRNA への結合が阻害されると考えられた(図 1)。

LZD 耐性 CNS は、50S ribosome peptidyltransferase center (PTC) を形成する ribosome protein L3 に変異が生じていた。

(4)海外で報告された耐性因子 *cfrr* (gene encoding an enzyme for methylation of the 23S rRNA at position A2503)は、すべての耐性菌で陰性であった。

表 1 国内で分離された LZD 耐性 CNS の耐性関連因子

CNS : coagulase-negative *Staphylococcus*

strain	species	MIC _{LZD} (µg/mL)	23S rRNA domainV	L3
I-0553	<i>S. capitis</i>	8	G2576U()	Thr83Ala
I-0676	<i>S. capitis</i>	16	G2576U()	Thr83Ala
I-1184	<i>S. capitis</i>	16	G2576U()	Thr83Ala Ala142Thr
2648	<i>S. capitis</i>	32	G2576U()	Thr83Ala
I-0202	<i>S. epidermidis</i>	4	U2500A	Leu101Val
I-0237	<i>S. epidermidis</i>	16	G2576U()	Leu101Val

: 6 コピーの内少なくとも 1 つに変異がある

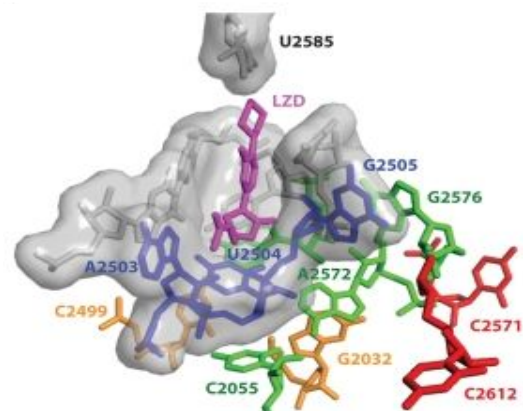


図 1 LZD と ribosome 50S subunit の結合モード : LZD は、ribosome の A site pocket に結合して蛋白合成を阻害する。

D. 考察

(1) RImCD とそれに続く RImA^{II} による段階的な rRNA 修飾が肺炎球菌の TEL 感受性に寄与すると考えられた。

(2) 臨床より分離された LDZ 耐性 CNS の耐性機構は、23S rRNA G2576U の変異と ribosomal protein L3 の変異によるものと考えられた。

E. 結論

肺炎球菌は先行研究で明らかにした外来性 *ermB* メチル化酵素遺伝子の獲得と、本研究で明らかにした 23S rRNA の Hairpin35 領域の RImCD と RImA^{II} メチル化システムの欠損によってもたらされることが明らかとなった。本年度の研究で解明した TEL の新型耐性機構の解明は、ケトライド耐性肺炎球菌の出現の予知情報の提供に貢献するものである。さらに本研究結果は、国内の臨床において LDZ 耐性化が進行していることを明らかにしたものであり、それらを防止する為に調査と監視を継続しつつ、実効ある対策が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takaya, A., Sato, Y., Shoji, T., Sone, K., Yamamoto, T.

Methylation of 23S rRNA nucleotide G748 by RImA^{II} methyltransferase renders *Streptococcus pneumoniae* telithromycin-susceptible. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:3789-3796 (2013)

2. 学会発表

1) 木村旭・高屋明子・石和田稔彦・渡邊正治・野村文夫・山本友子

リネゾリド長期投与によるリネゾリド耐性 Coagulase-negative *Staphylococcus* の出現と耐性化機構

第 96 回日本細菌学会関東支部総会 東京 2013

2) 庄司竜麻・高屋明子・鈴木勉・木村聡

佐藤慶治・山本友子

肺炎球菌の rRNA 段階的修飾によるテリスロマイシン感受性 日本細菌学会関東支部会インターラボセミナー 東京 2013

3) 庄司竜麻・高屋明子・佐藤慶治・山本友子 肺炎球菌のテリスロマイシン感受性に寄与する rRNA 段階的修飾 第 86 回日本細菌学会総会 東京 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

