

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

分担研究課題：新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明

臨床分離大腸菌におけるプラスミド伝達性キノロン耐性遺伝子の耐性機構に関する研究

研究分担者 荒川 宜親（名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学 / 耐性菌制御学・教授）
研究協力者 川村 久美子（名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・准教授）
後藤 謙介（名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・大学院生）
服部 達也（名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・大学院生）

研究要旨：近年、臨床分離 腸内細菌科菌種におけるプラスミド伝達性キノロン耐性(PMQR)遺伝子の保有率の増加が問題となりつつある。我々は、これまでの研究で細菌がPMQR 遺伝子(*qnrA*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*)を獲得する意義について解析を進めてきた。そして、fluoroquinolone (FQ)高度耐性大腸菌の中で主流となっている O25b:H4-ST131 株において、*qnrA* 遺伝子の獲得が ciprofloxacin (CPF)存在下における細菌の生存延長に寄与することを見いだした。本研究では、さらに研究をすすめて、様々な血清型の FQ 感性大腸菌を用いて *qnrA* 遺伝子の獲得が細菌の生存力へ寄与することを確認するとともに、本遺伝子の獲得がキノロン耐性決定領域(QRDRs)変異の獲得ならびに FQ 耐性化の促進に影響するか否かについて解析を行った。菌株は FQ 感性大腸菌 13 株(O1, O6, O18, O25, O74, O78, OUT)を用い、それらに *qnrA* 遺伝子を形質転換にて導入し、CPF の MIC, 最小殺菌濃度(MBC)および耐性菌出現阻止濃度(MPC)の測定を行った。全ての親株ならびに *qnrA* 導入株について、 $2 \times$ MIC または $3 \times$ MIC の CPF 暴露時における殺菌効果曲線を作成した。O1 株および O25 株については CPF に対する適応耐性試験もあわせて実施した。*qnrA* 遺伝子を導入した結果、CPF の MIC, MBC, MPC はいずれも親株と比較して上昇しており、特に、O25 株における MBC および MPC は他の血清型よりも高い値を示した。*qnrA* 導入株における $2 \times$ MIC の CPF 暴露では、O1, O6, O25 株の生存延長が認められたが、残りの菌株 (O18, O74, O78, OUT)では菌の死滅が確認された。一方、 $3 \times$ MIC の CPF 暴露において、菌の生存が確認されたものは O25 株のみであった。適応耐性試験では、親株、*qnrA* 導入株とも継代回数に伴って CPF の MIC が上昇した。しかし、これら適応耐性株における *gyrA* 遺伝子の QRDRs 変異は、*qnrA* 遺伝子を保有しない親株が最も早い結果となった。本研究から、低度 FQ 耐性を付与する *qnrA* 遺伝子の獲得は致死濃度の CPF 暴露時における細菌の生存を延長させるが、必ずしも QRDRs 変異獲得および蓄積を促進させないことが明らかとなった。

A. 研究目的

臨床現場における fluoroquinolones (FQs) の使用増加に伴い、急激に FQs 耐性菌が増加している。従来、その耐性メカニズムは FQs の作用点である DNA ジャイレーズ (*GyrA*)およびトポイソメラーゼ (*ParC*)におけるキノロン耐性決定領域(QRDRs)のアミノ酸置換が主たるものであったが、新たにプラスミド伝達性キノロン耐性 (PMQR)遺伝子が発見され、腸内細菌科菌種の間で急速に広まりつつある。しかし、これら PMQR 遺伝子は低度 FQs 耐性を付与する

に留まるため、細菌がなぜそれら遺伝子を獲得するかについて研究者の関心が集まっている。我々は、これまでの研究で細菌がPMQR 遺伝子(*qnrA*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*)を獲得する意義について解析を進めてきた。そして、FQ 高度耐性大腸菌の中で主流となっている O25b:H4-ST131 株においては、*qnrA* 遺伝子の獲得が ciprofloxacin (CPF)存在下における細菌の生存を延長させることを見いだした。しかしながら、本現象が各種 O 抗原に普遍的であるか否か、また FQ 高度耐性化への関与については、未だ不明のまま

までである。本研究では、*qnrA* 遺伝子の獲得が細菌の生存力へ寄与することを様々な血清型の FQ 感性大腸菌を用いて証明するとともに、本遺伝子の獲得が QRDRs 変異の獲得ならびに FQ 耐性化の促進に影響するかどうかについて明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

菌株には、FQs に感性を示す大腸菌 13 株 (O1, O6, O18, O25, O74, O78, OUT) を用いた。はじめに使用菌株の MLST 解析および PCR によるタイピングを実施した。各株に *qnrA* 遺伝子を導入後、CPFEX の MIC、最小殺菌濃度 (MBC) ならびに耐性菌出現阻止濃度 (MPC) を測定した。MIC 測定は Etest により、MBC および MPC は既報に従い、実施した。以後、空ベクターを各株に導入したものを親株とした。次に、全ての親株ならびに *qnrA* 導入株を対象にして、 $2 \times \text{MIC}$ または $3 \times \text{MIC}$ の CPFEX に暴露後の殺菌効果曲線を作成した。さらに CPFEX 存在下での生存延長が確認された O1 株および O25 株について、CPFEX に対する適応耐性試験を実施した。CPFEX の暴露濃度はそれぞれの菌株の $1/2 \times \text{MIC}$ に設定し、20 回の継代培養を行った。そして、得られた適応耐性株における CPFEX の MIC の変化を解析するとともに、*gyrA*, *parC* 遺伝子における QRDRs の塩基配列解析を行った。

C. 研究結果

MLST 解析および PCR によるタイピングの結果、大腸菌 13 株の内 7 株が ST95 と同定され、O25 株および OUT 株の 3 株は O25b-ST131 と同定された。*qnrA* 遺伝子の導入により CPFEX の MIC は親株と比較して 20.8-31.7 倍程上昇したが、その値は感性のままであった ($\leq 1 \mu\text{g/mL}$)。また MBC および MPC も同様に *qnrA* 遺伝子の導入によって上昇しており、特に O25 株における *qnrA* 導入株の MBC および MPC はそれぞれ $0.75\text{-}1.14 \mu\text{g/mL}$, $3\text{-}4 \mu\text{g/mL}$ と他の血清型よりも高い値を示した (Table 1)。

殺菌効果曲線による検討では、 $2 \times \text{MIC}$ の CPFEX 暴露において、親株は全て暴露開始から 48 時間経過するまでに菌が完全に死滅した。一方、*qnrA* 導入株では、O1, O6, O25 株の 6 株は暴露開始から 48 時間経過後も菌の生存が確認されたが、残りの菌株 (O18, O74, O78, OUT) は 48 時間以内に菌が完全に死滅していた (Figure 1)。 $3 \times \text{MIC}$ の CPFEX 暴

露では、暴露から 48 時間経過後も菌の生存が確認されたものは、O25 株のみであった (Figure 2)。

CPFEX 存在下での生存延長が確認された O1 株と O25 株で実施した適応耐性試験では、両 O 抗原とも継代回数に伴って親株ならびに *qnrA* 導入株における CPFEX の MIC が上昇した。20 回継代後の親株の MIC は O1 株が $0.5 \mu\text{g/mL}$ 、O25 株が $4 \mu\text{g/mL}$ に達し、*qnrA* 導入株の MIC は O1 株および O25 株ともに $32 \mu\text{g/mL}$ に達した (Figure 3)。適応耐性株における *gyrA* 遺伝子の QRDRs 変異はいずれの菌株でも確認され、変異によるアミノ酸置換は全て Ser83-Lue であった。変異獲得時期は O25 株の親株が 4 週目と最も早く、続いて O25 株の *qnrA* 導入株 (13 週目)、O1 の親株 (14 週目)、*qnrA* 導入株 (15 週目) の順となり、両 O 抗原ともに親株の方が早い結果となった (Table 2)。一方、*parC* 遺伝子の QRDRs 変異は、両 O 抗原ともに *qnrA* 導入株のみで継代 17 週目に確認された (Ser80-Arg/ParC)。

D. 考察

qnrA 遺伝子の獲得によって細菌は FQs に対して低度耐性を獲得すると報告されており、本研究においても、CPFEX の MIC, MBC および MPC の上昇は同程度であった。興味深いことに、O25 株の MBC および MPC の値は他の O 抗原よりも高く、特に MPC ($3\text{-}4 \mu\text{g/mL}$) は CPFEX 500 mg を 1 日 2 回経口投与した際の最高血中濃度と同程度もしくはそれを上回る値となった。従って、O25 株における *qnrA* 遺伝子の獲得は、CPFEX 治療下での長期間の生存を可能とし、FQ 耐性化において有利に働いているものと考えられる。

実際に、今回の殺菌効果曲線による検討では *qnrA* 遺伝子導入によって生存延長が確認された。加えて、Briales ら (Antimicrob Agents Chemother, 2011) や Allou ら (Antimicrob Agents Chemother, 2009) も同様に *qnrA* 遺伝子の獲得が CPFEX 存在下での細菌の生存を延長させると報告しており、細菌が致死濃度の CPFEX に暴露された際に、*qnrA* 遺伝子の獲得が細菌の生存延長に寄与することは確からしいと考えられる。一方で、同一の ST を示す O25-ST131 株と OUT-ST131 株の間では生菌数の減少傾向に明確な差が確認されており、*qnrA* 遺伝子獲得による生存延長には、O 抗原の発現の有無が関与していることが疑われた。さらに O25-ST131 株は、唯一 $3 \times \text{MIC}$ の CPFEX 暴

露でも生存が確認されており、*qnrA* 遺伝子獲得による生存延長の影響を最も強く受けることが示唆された。

qnr 遺伝子の獲得は FQ 暴露時の細菌の生存を延長させる他に、FQ 耐性化を促進させる働きがあると考えられてきたが、本研究の適応耐性試験において QRDRs 変異獲得時期は親株が最も早く、従来の仮説と異なる結果を示した。一方で、Cesaro ら (J Antimicrob Chemother. 2008) の解析では高濃度の CPFX や moxifloxacin による暴露において、QRDRs 変異の獲得頻度は親株の方が *qnr* 導入株よりも高いと報告しており、解析方法は異なるものの本研究の結果と傾向が一致した。このことから *qnrA* 遺伝子の獲得は、QRDRs 変異の獲得および蓄積を促進しないことが示唆された。おそらくこれは、*qnrA* 遺伝子獲得による CPFX 存在下での生存延長が、細菌にとって増殖に不利となる QRDRs 変異を早期に獲得する必要性を低くしているためであると考えられる。しかし、これらはすべて *in vitro* における解析結果であるため、今後は *in vivo* での解析が求められる。

E. 結論

本研究から、特定の血清型や遺伝的背景によって傾向は異なるものの、低度 FQ 耐性を付与する *qnrA* 遺伝子の獲得は致死濃度の CPFX 暴露時における菌株の生存を延長させるが、必ずしも QRDRs 変異獲得や蓄積を促進させないことが明らかとなった。さらに、*qnrA* 遺伝子の獲得がもたらす生存力への影響は O25 株が最も強く、これが大腸菌 O25b:H4-ST131 の世界的な蔓延の一因となっている可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

• Contribution of QnrA, plasmid-mediated quinolone resistance peptide, to survival of *Escherichia coli* exposed to lethal ciprofloxacin concentration. Jpn. J. Infect. Dis. 2014. *in press*

2. 学会発表

1) Goto K., Kawamura K. and Arakawa Y. Contribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes to QRDR mutations in *Escherichia coli*. 第 86 回 日本細菌学会総会. 日本細菌学会誌. 2013. 第 68 巻, 189 項

2) Goto K., Kawamura K.a and Arakawa Y. Contribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes to QRDR mutations in *Escherichia coli*. 第 28 回国際化学療法学会. 予稿集 52 頁

3) 後藤謙介, 川村久美子, 荒川宜親. 大腸菌のフルオロキノロン耐性獲得におけるプラスミド伝達性キノロン耐性遺伝子 *qnrA* の寄与. 第 25 回日本臨床微生物学会総会. 日本臨床微生物学雑誌. 2013. 第 23 巻, 203 項

4) Goto K., Kawamura K., Arakawa Y. Contribution of QnrA to survival of *Escherichia coli* exposed to lethal ciprofloxacin concentration. 第 87 回日本細菌学会総会. 日本細菌学会雑誌. 2014. 69, 195 項

H. 知的財産権の出願・登録状況
特記すべきもの無し