

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

分担課題 グラム陽性菌の新型薬剤耐性に関する研究

研究分担者 山本友子（千葉大学大学院薬学研究院・微生物薬品化学・教授）
研究協力者 高屋明子（千葉大学大学院薬学研究院・微生物薬品化学・准教授）
佐藤慶治（千葉大学大学院薬学研究院・微生物薬品化学・助教）
石和田稔彦（千葉大学医学部附属病院・感染症管理治療部・講師）

研究要旨

本研究では、国内の肺炎球菌のケトライド耐性化の現況、新型耐性機構並びに耐性伝播機構を解明することを目的として、2009~2010 年に全国の医療機関で分離された 500 株の肺炎球菌について テリスロマイシン（ケトライド系抗菌薬）耐性に関する多面的な研究を行い、テリスロマイシン耐性菌がわずかながら出現していることを明らかにした。耐性機構に関する分子遺伝学的解析を行い、テリスロマイシン耐性の主要因は高発現 *ermB* 遺伝子の獲得であることを明らかにした。さらに、内因性メチル化酵素 RImA と RImCD の欠損によりテリスロマイシン耐性をもたらすことを見出した。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。本研究では、国内の臨床より分離されたリネゾリド耐性ブドウ球菌の耐性機構について研究を行い、rRNA の変異の蓄積が耐性の上昇をもたらすこと、さらに内因性メチル化酵素 RImN の欠損が耐性に関連することを明らかにした。

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（ミュラーヒントン寒天培地 + 5% 馬脱繊維血）を用い、37℃、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。

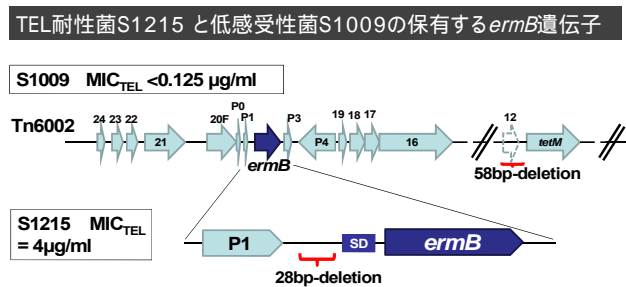
C. 研究結果

1 肺炎球菌のテリスロマイシン耐性機構

- (1) 2009年～2010年に全国の医療機関で分離された500株の肺炎球菌からTEL耐性菌1株を検出した。
- (2) S1215(MIC=4 µg/ml)のTEL耐性の主要因は、*ermB*がコードするメチラーゼによる23S rRNA A2058のメチル化であった。*ermB*遺伝子の構造遺伝子とリーダーペプチド遺

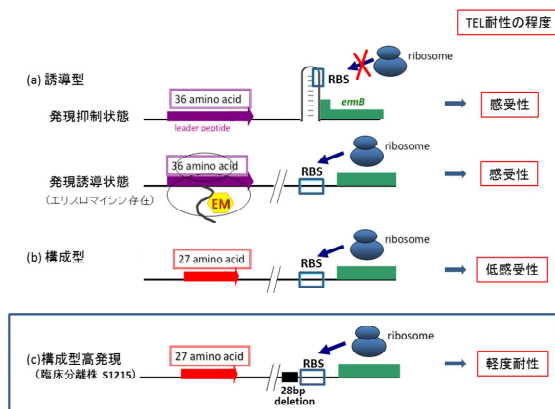
伝子の間に28bpの欠失がErmBメチラーゼ高発現を引き起こし、TEL耐性をもたらしたと推論できた。

(3) S1215の*ermB*遺伝子はTn6002様トランスポゾンによって伝搬することを明らかにした。

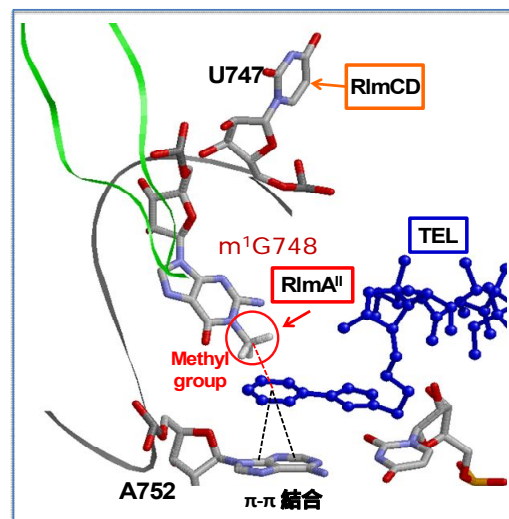


(4) 肺炎球菌の新型テリスロマイシン耐性機構を見出した。すなわち23S rRNAのG748位を修飾する内因性メチル化酵素RimAならびにU747位をメチル化するRimCDの変異がTEL高度耐性をもたらすことを明らかにした。RimCDによるU747のメチル化はRimAによるG748のメチル化を促進した。遺伝生物学的解析および構造エネルギー計算によりRimAによるG748位のメチル化がテリスロマイシンのA752位への結合を強め、この安定した結合が肺炎球菌に対する強い抗菌活性の主要因であることを明らかにした。

ermB 構成型高発現変異による肺炎球菌のエリスロマイシン軽度耐性化

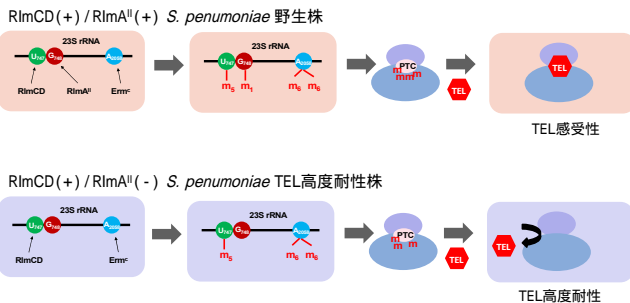


ermB の翻訳制御モデルとTEL耐性
(a)誘導型、(b)構成型、(c)構成型高発現



RlmAとRlmCDによる23S rRNAのメチル化とTELの結合

ermB の獲得と内因性rRNAメチル化システムの崩壊により肺炎球菌はテリスロマイシン高度耐性となる。



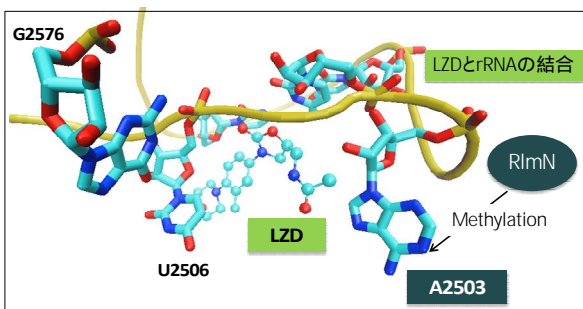
II ブドウ球菌ののリネゾリド耐性機構

2014年に、国内の1臨床機関において病巣より分離された6株のLZD耐性 coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) について耐性関連因子を解析し、rRNAの変異 G7526U の蓄積が耐性の高度化をもたらすことを明らかにした。

臨床分離(2012年~2014年)リネゾリド耐性CoNSの耐性関連因子

Strain	Collection date (month/year)	Clinical sample	MIC ₅₀ (μg/mL)	Mutations in 23S rRNA domain V allele sequence					
				<i>rrIA</i>	<i>rrIB</i>	<i>rrIC</i>	<i>rrID</i>	<i>rrIE</i>	<i>rrIF</i>
I-0553	May-2012	Vascular catheter	8	-	-	-	G2576U	G2576U	G2576U
I-0676	Jun-2012	Digestive organ	16	-	-	-	G2576U	G2576U	G2576U
I-1184	Sep-2012	Vascular catheter	16	G2576U	-	G2576U	G2576U	G2576U	G2576U
I-2648	Dec-2013	Blood culture	32	deletion	-	G2576U	G2576U	G2576U	G2576U
I-0507	Apr-2014	Vascular catheter	32	deletion	G2576U	G2576U	G2576U	G2576U	G2576U

CoNS: Coagulase-negative *Staphylococcus*



ブドウ球菌のRlmNによりメチル化されたrRNAとリネゾリド(LZD)の結合安定性

さらに内因性 rRNA の A2503 をメチル化する酵素 RlmN の欠損が LZD 耐性に関連することを明らかにした。図に構造エネルギー

ー計算より算出したメチル化 rRNA と LZD の結合安定性を示した。これに基づき、内因性 rRNA メチル化酵素によって修飾された 23SrRNA と LZD との結合について下記のように推論することができた。

内因性メチル化酵素 RlmN は A2503 を修飾するが、この修飾は LZD とその標的 U2506 との相互作用に影響する。RlmN の変異は LZD と標的 U2506 との結合を弱め、耐性をもたらすと考えられる。

D. 考察

(1) 肺炎球菌のテリスロマイシン耐性は外来性の rRNA メチル化酵素 ErmB の獲得と内因性 rRNA メチル化酵素の欠失によりもたらされると考えられた。RlmCD とそれに続く RlmA による段階的な rRNA 修飾が TEL の標的への結合を強め、肺炎球菌の TEL 感受性に寄与すると推論できる。

(2) 臨床より分離された CNS の LZD 耐性は、標的の rRNA の変異に蓄積と RlmN の欠損によりもたらされたと考えられた。内因性 RlmN による rRNA の修飾が、LZD の標的への結合すなわち LZD 感受性に関与すると推論できる。

E. 結論

肺炎球菌は外来性 *ermB* メチル化酵素遺伝子の獲得と、23S rRNA の Hairpin35 領域の RlmCD と RlmA 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。本研究で解明した TEL の新型耐性機構は、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 LZD 耐性化が進行していることを明らかにした。23S rRNA を標的とする抗菌薬の作用には、内因性の修飾酵素による rRNA のメチル化が深く関わることを明らかにした。

本研究結果はリボソーム標的抗菌薬に共通する新型耐性機構を明らかにしたと同時に、新規リボソーム標的抗菌薬開発に重要な理論を提供するものである。

F. 健康危険情報

国内の臨床においてLDZ耐性化が進行している。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

- 1) Takaya A, Kimura A, Sato Y, Ishiwada N, Watanabe M, Matsui M, Shibayama K, Yamamoto T. Molecular characterization of linezolid-resistant CoNS isolates in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.* 69(11)
Doi:10.1093/jac/dku443
- 2) Takaya A, Sato Y, Shoji T, Yamamoto T. Methylation of 23S tRNA nucleotide G748 by RlmA^{II} methyltransferase renders *Streptococcus pneumoniae* telithromycin susceptible. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:3789-3796 (2013)

2. 学会発表

- 1) 高屋明子 . グラム陽性菌の内因性 rRNA 修飾と薬剤耐性. *感染症研究グローバルネットワークフォーラム 2014* , 2014
- 2) 高屋明子 , 木村旭 , 佐藤慶治 , 石和田稔彦 , 渡辺正治 , 松井真理 , 柴山恵吾 , 山本友子 . 臨床由来コアグラウゼ陰性ブドウ球菌のリネゾリド耐性機構 . *第 43 回薬剤耐性菌研究会* , 2014
- 3) 庄司竜麻 , 高屋明子 , 木村聡 , 鈴木勉 , 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 内因性修飾 . *第 97 回日本細菌学会関東支部総会* , 2014
- 4) Takaya A, Kimura Y, Sato Y, Yamamoto T : Genetical Assessment of Linezolid Resistance Mechanisms in *Staphylococcus capitis* Isolated Clinically. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014
- 5) 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 87 回日本細菌学会総会* , 2014

- 6) 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 . *インターラボセミナー* , 2014
- 7) 木村旭 , 高屋明子 , 石和田稔彦 , 渡辺正治 , 野村文夫 , 山本友子 . リネゾリド長期投与におけるリネゾリド耐性 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* , 2013
- 8) 庄司竜麻 , 高屋明子 , 佐藤慶治 , 山本友子 . 肺炎球菌リボソームと TEL の相互作用におけるリボソーム内因性修飾酵素の影響 . *第 7 回細菌学若手コロッセウム* , 2013
- 9) 庄司竜麻 , 高屋明子 , 佐藤慶治 , 山本友子 . RlmA^{II} 不活化に夜肺炎球菌のテリスロマイシン耐性化機構 . *第 86 回日本細菌学会総会* , 2013
- 10) Takaya A, Yamamoto T . Inactivation of RlmA^{II} confers the telithromycin-resistance to *Streptococcus pneumoniae*. *II International Conference on Antimicrobial Research*, 2012
- 11) 高屋明子 , 庄司竜麻 , 佐藤慶治 , 山本友子 . 肺炎球菌のリボソームメチル化とマクロライド・ケトライド耐性 . *第 41 回薬剤耐性菌研究会* , 2012
- 12) Takaya A, Sato Y, Yamamoto T . The antibiotic mechanism of telithromycin in *Streptococcus pneumoniae* . *第 85 回日本細菌学会総会* , 2012
- 13) Shibata T, Takaya A, Sato Y, Yamamoto T . Mechanism of telithromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolated clinically in Japan . *第 85 回日本細菌学会総会* , 2012