

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591803

研究課題名（和文）動物モデルを使った尿路病原性大腸菌のキノロン耐性誘導機序の解明

研究課題名（英文）Induction of fluoroquinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* using animal models

研究代表者：

山本 新吾 (YAMAMOTO SHINGO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：80322741

研究成果の概要（和文）：

キノロン感受性尿路病原性大腸菌89株を低濃度～中濃度レボフロキサシン（LVFX）含有アガー培地にて培養し、LVFX 4～32 μ g/mlで発育する耐性株を5株誘導した。これらの元株の多くはすでに1～2ヶ所のQRDR変異を有しており、すべての株において薬剤排出ポンプ *marA* の高発現が認められた。キノロン耐性獲得に有利な初期条件として、1～2ヶ所のQRDR遺伝子変異、*marA*を代表とする薬剤排出ポンプの重要性が示された。キノロン耐性を誘導しにくい理想的な抗菌薬投与方法のひとつとして、薬剤排出ポンプ機構を阻害する薬剤が有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Five fluoroquinolone-resistant (4～32 μ g/ml) *Escherichia coli* strains were developed by culture of 89 fluoroquinolone-susceptible isolates on agars including low to high concentration of levofloxacin. The original strains of these 5 resistant strains had one or two point-mutations in quinolone resistance-determining regions (QRDR). Further, the 5 resistant strains showed high RNA expression of *marA*, an efflux pump for antibiotics, determined by real time PCR. These results showed that a few point-mutations in QRDR and high expression of *marA* would be required as the first step for the acquisition of fluoroquinolone-resistance, indicating that inhibition of the efflux pump for antibiotics could be a good candidate for the strategy to prevent the induction of fluoroquinolone-resistance in treatment of urinary tract infections caused by uropathogenic *E. coli*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：尿路病原性大腸菌、キノロン耐性、QRDR 遺伝子変異、薬剤排出ポンプ

1. 研究開始当初の背景

大腸菌は尿路感染症において最も高頻度に分離され、尿路感染症起炎菌の約70~80%を占める。大腸菌は一般抗菌薬に良好な感受性を示し、比較的治療の容易な菌種と考えられてきたため、国内のガイドラインにも示されているように、急性単純性尿路感染症にはキノロンが第一選択として使用されている。しかし、近年各種抗菌薬に対する耐性率の著明な増加が指摘されており、例えばキノロン耐性率は単純性尿路感染症で約10%、複雑性尿路感染症では約30-40%の耐性率が報告されている。抗菌薬耐性菌の増加は市中感染症における治療の長期化・複雑化、院内感染の増加、さらには医療費の高騰の原因となり、その病態の解明は緊急かつ重要な問題である。大腸菌をはじめとする多くの菌種でのキノロン耐性率の増加はキノロン製剤の頻用に起因すると考えられるが、キノロン製剤は現代における代表的な抗菌薬のひとつであり、キノロン製剤なしで感染症治療戦略を構築するのは困難である。そのため、キノロン耐性を誘導させずに効果的に感染症治療効果を発揮できるようなキノロン製剤の投与方法を開発する必要がある。

最近我々は、国内で分離された尿路感染症由来キノロン耐性大腸菌約89株と感受性89株について、系統分類(A, B1, B2, D)およびQRDR(キノロン耐性決定領域)の変異を調査した。その結果、キノロン感受性株に比較して、キノロン耐性株においてはB2群の比率が著しく低下しており(78% vs 49%)、D群の増加が顕著であった(12% vs 35%)。また、B2群における*usp* subtypeを調べたところ、感受性株において42%に過ぎなかった*usp* subtype 2aが、耐性株では82%と効率に認められた。これら耐性株のQRDR(キノロン耐性決定領域)遺伝子の変異を調べたところ、すべてのキノロン耐性株に3ヶ所以上の変異が認められ、そのうち*gyrA*のSer83LeuとAsp87Asn、*parC*のSer80IleとGlu84Valの4ヶ所の変異を持つ株がもっとも多く(42%)、このタイプのQRDR遺伝子変異を持つ株の約97%がB2群に属していた。以上のことより、キノロン耐性獲得とは特定の尿路病原性大腸菌に特異的に起こりやすい現象である可能性が示唆された(Takahashi et al, J Clin Microbiol, 2009)。

一方、Yasufukuらは、尿路感染症から分離されたキノロン感受性および耐性大腸菌株の薬剤排出ポンプmarA、yhiU、

mdfA、yhiVのmRNAレベルを調べ、marAとmdfAのmRNAレベルがキノロン耐性菌に有意に高いことを報告している

(Yasufuku et al, J Clin Microbiol, 2011)。一方Tavioらは、キノロン感受性大腸菌からキノロン感受性菌を誘導すると、薬剤排出ポンプmarAおよびquorum sensing調整蛋白sdiAの高発現が認められた、と報告している(Tavio et al, J Antimicrob Chemother, 2010)。同様に、大腸菌のキノロン耐性誘導初期においては薬剤排出ポンプacrABが重要であるという報告や(Singh et al. Antimicrob Agent Chemother, 2011)、サルモネラのキノロン耐性誘導において薬剤排出ポンプシステムacrB-tolCが必須である(Ricci et al, Antimicrob Agent Chemother, 2006)、などの報告がなされているが、一定の見解は得られていない。

2. 研究の目的

研究を開始するにあたり、当初企画していた研究方法にいくつか困難な点があることが判明した。まず低~中濃度キノロン含有液体培地によってキノロン耐性株を誘導することを計画していたが、液体培地では誘導は困難であった。この問題点は液体培地をアガー培地に変更することにより克服され、安定してキノロン耐性を誘導する系を構築することができた。しかし、そのために液体培地を基本とする尿路上皮侵入モデル構築が困難となったこと、また研究開始初期に、キノロン耐性獲得における薬剤排出ポンプやquorum sensing機構の重要性を示唆する論文がいくつか報告されるに至り、下記のように研究目的を変更し、遂行した。

本研究では、我々の保有するキノロン感受性大腸菌98株を使用してキノロン耐性を誘導する過程において、キノロン耐性を獲得しやすい菌株がどのような系統分類(A, B1, B2, D)、病原因子、*usp* subtypeを保有しているのか、またどのような機序によりキノロン耐性を獲得していくのかを解明することを目的とした。

具体的には、尿路感染症由来キノロン感受性89株を低濃度~高濃度キノロン含有アガー培地で順次継代培養することにより、キノロン中等度~高度耐性株を誘導した。これらの中中等度~高度キノロン耐性株とそれらの元株であるキノロン感受性株のQRDR遺伝子変異ならびに薬剤排出ポンプ(marA、yhiU、mdfA、

yhiV, acrB, tolC) および quorum sensing 調整蛋白 sdiA の mRNA レベルを比較し、キノロン耐性獲得の初期～中期に見られる現象を遺伝子学的変化ならびに各蛋白発現の変化の双方から解析した。

3. 研究の方法

(1) 尿路感染症から分離されたキノロン感受性 (MIC 0.016~0.5 μ g/ml) 尿路病原性大腸菌 89 株 (系統分類 A 5 株、B1 4 株、B2 69 株、D 11 株) をレボフロキサシン (LVFX) 0.5~8 μ g/ml 含有アガー培地で 1 週間培養し、LVFX 中等度耐性菌を選別した。

(2) さらに (1) で選別された株を LVFX 4~64 μ g/ml 含有アガー培地で 1 週間培養し、LVFX 高度耐性菌を選別した。

(3) (1) (2) で誘導された LVFX 中等度~高度耐性菌とそれらの元株である LVFX 感受性菌を培養し、キノロン感受性株の QRDR 遺伝子変異ならびに薬剤排出ポンプ (marA, yhiU, mdfA, yhiV, acrB, tolC) および quorum sensing 調整蛋白 sdiA の mRNA 発現レベルを比較した。リアルタイム PCR を用い、ATCC 25922 をコントロール株として、各 mRNA 発現量を gapA で補正して比較した。

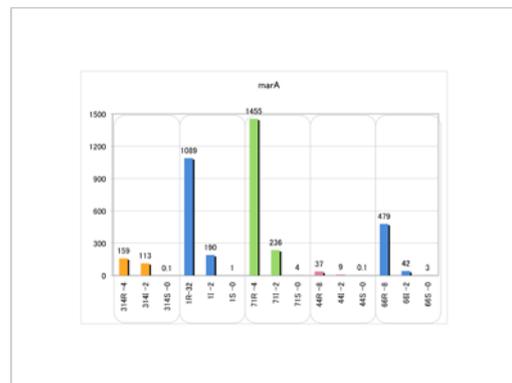
4. 研究成果

(1) キノロン感受性 89 株を LVFX 0.5~8 μ g/ml 含有アガー培地で 1 週間培養し、LVFX 中等度耐性菌を選別したところ、5 株 (系統分類: B2 2 株、D 3 株; usp subtype: 1a 2 株、2b 1 株、(-) 2 株) が LVFX 2 μ g/ml 含有アガー培地で発育した。これらの元株の LVFX MIC は感受性株のなかでもやや高く 0.25~1.0 μ g/ml であった。これらの元株の QRDR シークエンスには 5 株中 4 株に *gyrA*: Ser83Leu の変異がすでに認められ、さらにそのひとつには *parC*: Asp475Glu の変異が認められていた。しかし、中等度 LVFX 耐性株には新たな QRDR 変異は認められなかった。

(2) さらに (1) で選別された株を LVFX 4~64 μ g/ml 含有アガー培地で 1 週間培養し、LVFX 高度耐性菌を選別したところ、それぞれ LVFX 4~32 μ g/ml 含有アガー培地で発育した。系統分類の内訳は LVFX 4 μ g/ml 含有アガー培地で B2 1 株、D 1 株、LVFX 8 μ g/ml 含有アガー培地で B2 1 株、D 1 株、LVFX 32 μ g/ml 含有アガー培地で D 1 株であった。QRDR シークエンスを調べたところ、LVFX 32 μ g/ml 含有アガー培地で発育した菌株には、元株に認められた *gyrA*: Ser83Leu に加えて *gyrA*: Asp87Gly 変異があらたに認められ

た。

(3) ATCC 25922 をコントロールとして、キノロン感受性元株 5 株とそれらから誘導された、中等度耐性 5 株 (LVFX 2 μ g/ml)、高度耐性 5 株 (LVFX 4~32 μ g/ml) の薬剤排出ポンプ 6 種類 (marA, yhiU, mdfA, yhiV, acrB, tolC) および quorum sensing 調整蛋白 sdiA の mRNA 発現レベルを比較したところ、LVFX 耐性が高度になるにつれて marA, mdfA, acrB, tolC, sdiA の mRNA の高発現が認められた。しかしこれらのうち、mdfA, acrB, tolC, sdiA の mRNA 発現レベルの増加は不安定であり、高くても約 5~10 倍の増加に過ぎなかったが、marA においては複数回の実験系において常に 100~1000 倍の増加を示した。



(4) 以上の結果より、キノロン耐性獲得に有利な初期条件として、1~2ヶ所の QRDR 遺伝子変異、marA を代表とする薬剤排出ポンプや quorum sensing 調整蛋白の高発現、などが重要であることが示された。さらにキノロン耐性誘導の各ステップにおける薬剤排出ポンプ、quorum sensing、QRDR 遺伝子変異の重要性を解析することにより、例えば薬剤排出ポンプまたは quorum sensing を阻害する方法で、キノロン耐性誘導を回避しつつ有効な感染症治療効果を発揮できる抗菌薬投与方法の開発も可能であると考える。今後は、薬剤排出ポンプまたは quorum sensing を有効かつ安全に阻害しえる薬剤を検索し、それらの菌増殖抑制効果およびキノロン製剤抗菌作用増強効果を in vitro および in vivo で検証していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 山本新吾、樋口喜英、兼松明弘、野島道生、倉園久生：尿路病原性大腸菌におけるキノロン耐性誘導と薬剤排出性ポンプの相関。第 24 回尿路感染症研究会 (西宮) 2013.10.5

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 新吾 (YAMAMOTO SHINGO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：80322741

(2) 研究分担者

倉園 久生 (KURAZONO HISAO)
帯広畜産大学・畜産学部・教授
研究者番号：90186487

野島 道生 (NOJIMA MICHIO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：90237842

樋口 喜英 (HIGUCHI YOSHIHIDE)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：20411994

兼松 明弘 (KANEMATU AKIHIRO)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90437202

(3) 連携研究者

()

研究者番号：