

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06521

研究課題名(和文) インフルエンザ菌のフルオロキノロン低感受性に関わる分子疫学および分子遺伝学的解析

研究課題名(英文) Epidemiological and molecular analysis of decreased susceptibility to fluoroquinolone in *Haemophilus influenzae*

研究代表者

佐藤 豊孝 (SATO, TOYOTAKA)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：30756474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：*Haemophilus influenzae*は気道常在菌であり、呼吸器感染症の起炎菌として知られる。キノロン系抗菌薬は本菌に対する有効な治療薬である。キノロン耐性*H. influenzae*の出現・拡大を阻止する上で、キノロン低感受性株の出現メカニズムの詳細な解析は重要であるが、明らかでない点が多い。本研究では、検査した全株がキノロン感受性であったが、64株中2株(3.1%)は感受性が低下しており、QRDR内にアミノ酸置換が認められた。キノロン誘導実験では55.2%がキノロン感受性の低下を起こし、34.4%がキノロン耐性を獲得した。またアンピシリン耐性とキノロン感受性低下に関連性が認められた。

研究成果の概要(英文)：*Haemophilus influenzae* is present as a commensal organism in upper respiratory tract and cause respiratory tract infections. Fluoroquinolone is one of the potent antimicrobial agent for the treatment. Although detail mechanical analysis of fluoroquinolone resistant development is important for prevent the emergence and spreading of fluoroquinolone resistant *H. influenzae*, that mechanism has been unclear. In this study, all *H. influenzae* clinical isolates exhibited susceptible to fluoroquinolone. However, 2 of the 64 (3.1%) isolates decreased susceptibility to fluoroquinolone with an amino acid substitution in QRDR. *in vitro* fluoroquinolone exposer experiment showed that 55.2% of *H. influenzae* clinical isolates decreased fluoroquinolone susceptibility and 34.4% was developed fluoroquinolone resistance. We also observed the significant association between decreased susceptibility to fluoroquinolone and ampicillin resistance.

研究分野：細菌学

キーワード：フルオロキノロン耐性 インフルエンザ菌

1. 研究開始当初の背景

(1) *Haemophils influenzae* は気道常在菌であり、肺炎、髄膜炎、中耳炎、副鼻腔炎等の起炎菌として知られる。BLNAR や BLPAR といった ampicillin(ABPC)耐性株が臨床問題となるが、キノロン系抗菌薬は本耐性株に対する有効な治療薬のひとつとして汎用されている。

(2) 現在、我が国における *H.influenzae* のキノロン系抗菌薬の感受性低下株は臨床現場で散見される(耐性率は 1%以下)程度で推移している。しかしながら、隣国の台湾を例にとると、本菌のキノロン低感受性率は 12.5%と高く、2004 年に比較し 2010 年では 24.3%低感受性率が上昇している(参考-1)。これは中国圏での抗菌性物質の乱用が関与していると考えられる。我が国でも、近年の ABPC 耐性株の顕著な上昇から、その治療にキノロン系抗菌薬の使用が今後増加することが考えられ、本剤の使用増加がキノロン耐性株の増加につながるものが危惧される。キノロン耐性 *H.influenzae* の出現および拡大を阻止する上で、その前段階にあたるキノロン低感受性株の出現機構に関する詳細な解析は重要であるが、明らかでない点が多い。

2. 研究の目的

(1) インフルエンザ菌のフルオロキノロン系抗菌薬低感受性化の現状と耐性株出現メカニズムを明らかにすることを目的とする。

(2) 呼吸器感染症には、Respiratory Quinolone が頻用される。今回そのひとつである Moxifloxacin(MFLX)を用い、キノロン系抗菌薬感受性低下のメカニズムについて検討を行う。また、近年増加しているアンピシリン耐性の有無が、キノロン耐性獲得へ与える影響についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 2015 年 9 月から 2016 年 12 月までに分離された *H.influenzae* 臨床分離株(計 64 株)の MFLX の MIC 値を測定し、臨床分離株におけるキノロン系抗菌薬感受性調査を行った。

(2) ABPC 耐性の有無(BLNAS 10 株、BLNAR 12 株、BLPAR 7 株)などから代表的な株を選出し、2 倍の MFLX MIC を添加した sBHI 寒天培地で培養し、感受性低下変異株の出現の有無をみる。出現した際には、変異株出現頻度を求め、本変異株をさらに同薬剤の濃度を上昇させて培養を行った。colony が出現しなくなるまで培養を継続し、MFLX 各濃度で得られた耐性変異株の各キノロン系薬剤、ABPC、クラリスロマイシン(CAM)の MIC 値と、標的遺伝子のキノロン耐性決定領域(QRDR)の変異を調べた。最終的に MFLX に耐性(MIC 2mg/L 以上)を示した株が得られた場合、これらの MLST 解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) 2015 年 9 月から 2016 年 12 月に分離された臨床分離株はすべて MFLX に感受性(MIC <2mg/L)を示した。MIC50 および MIC90 は 0.03 および 0.06mg/L であった。一方で、64 株中 2 株(3.1%)は MFLX MIC が 0.25mg/L であり、明らかに他の MFLX 感受性株よりも高い値を示した(図 1) この 2 株はどちらも GyrA の QRDR 内にアミノ酸置換(Ser84Leu)を有していた。

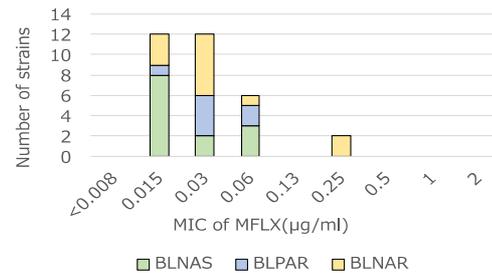


図 1. *H. influenzae* 臨床分離株における MFLX 感受性

当教室では、以前、2004 年から 2006 年における *H.influenzae* 臨床分離株 12/457 株(2.6%)に Ciprofloxacin(CPFX)感受性低下がみられたことを報告した(参考-2)。他の報告をみると、スペインでは 2000 年から 2013 年における臨床分離株 28/7267 株(0.39%)に CPFX 感受性低下がみられ、2000-2004 年では 0.26%、2005 年から 2009 年では 0.26%、2010 年から 2013 年では 0.36%と感受性低下株の増加は認めていないことを Puig らが報告している(参考-3)。一方、台湾では、臨床分離株 182/1462 株(12.5%)に Levofloxacin (LVFX) 非感受性株がみられ、2004 年の 2.0%に比較して 2010 年では 24.3%と増加していることを kuo らが報告している(参考-1)。当院では、現在まで臨床分離株 56 株に非感受性株はみられないが、2 株(3.6%)に感受性低下がみられ、いずれも BLNAR であり GyrA(Ser84Leu)の変異がみられた。以上から、*H.influenzae* のキノロン耐性率の上昇は認められていないことが確認できたが、一方で、耐性とは判断されないが、キノロン耐性獲得予備軍である低感受性株が存在していることが明らかとなった。

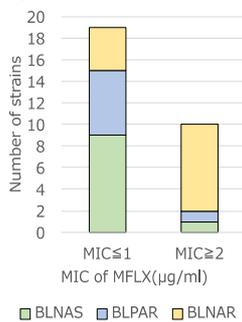
(2) 今回、in vitro で耐性化を誘導し、感受性低下から非感受性に至るまでの QRDR の変異部位とその頻度を段階的に検討した。in vitro での MFLX 耐性変異選択実験では、臨床分離株 29 株中 16 株(55.2%)が 2 倍の MFLX MIC 添加培地に発育を認めた。これらの変異株を継代し、それらの 2 倍の MFLX MIC となる添加培地に培養液を塗布し、さらなる変異株の選択を継続した。最終的に MFLX の MIC が

2mg/L以上の培地に発育を認めた変異株は10株(34.4%)であった。これらは現時点では、臨床現場でキノロン感受性株として存在するが将来的にキノロン耐性を獲得するリスクのある株であると考えられた。よって、キノロン感受性の低下が認められた株のMLST解析を行った(表1)。

表1. 感受性低下を示した株とそのMLST

strain	最終変異株の MFLX MIC (mg/L)	ST	MLST						
			adk	atpG	frdB	fucK	mdh	pgi	recA
SMHi 6 H	8	159	33	8	16	16	17	2	29
SMHi 11 H	0.5	404	1	1	1	14	49	111	5
Hui160 H	0.06	new	95	54	58	7	30	13	48
SMHi 2 H	32	34	11	2	15	8	28	26	3
SMHi 4 H	256	142	1	1	1	35	15	53	38
SMHi 9 H	4	156	26	2	15	7	22	56	3
SMHi 15 H	4	834	55	11	16	14	89	113	3
SMHi 17 H	4	422	14	7	1	30	1	21	1
SMHi 18 H	32	1218	33	8	16	16	17	2	127
SMHi 23 H	32	422	14	7	1	30	1	21	1
Hui436 H	1	1429	26	14	104	7	250	5	42
Hui440 H	16	14	5	1	1	1	1	2	5
SMHi 22 H	2	103	1	1	1	14	9	14	13
Hui 128 H	1	103	1	1	1	14	9	14	13
Hui 227 H	0.06	33	1	10	1	1	1	6	5
Hui410 H	0.5	986	35	1	22	36	7	58	29

その結果14のSequence type(ST)が同定された。つまりこれらのキノロン耐性を獲得する



リスクのある株は、少数のクローン集団によるものではなく、ある程度の遺伝的多様性を持っていることが明らかとなった。さらに、最終的にMFLXに耐性を獲得した10株中8株はBLNARであった。

(3) in vitro でキノロン感受性の低下が認められた16株の変異株出現頻度および耐性機構の解析を行った(表2)。

表2. MFLX感受性低下株のQRDRにおけるアミノ酸変異部位とその頻度

strain	MIC MFLX (µg/ml)	Amino acid change(s) in GyrA and frequency(CFU/ml)			Amino acid change(s) in GyrB and frequency(CFU/ml)			Amino acid change(s) in ParC and frequency (CFU/ml)				
		84 Ser	88Asp	153Glu	467Ser	469Glu	472Thr	82 Gly	83Asp	84Ser	88Glu	
SRI160 H	0.06				Tyr							
Hui227 H	0.06						Ile					
Hui410 H	0.5		Tyr									
SMHi11 H	0.5		Gly									
Hui128 H	1		Tyr									
Hui436 H	1		Tyr	Lys								
SMHi22 H	2		Asn									
SMHi15 H	4		Leu									
SMHi17 H	4		Leu									
SMHi9 H	4		Leu ¹¹									
SMHi6 H	8		Leu									
Hui440 H	16		Asn						Arg			
SMHi2 H	32		Asn	Lys ¹²		Tyr					Lys	
SMHi18 H	32		Leu ¹¹			Asp			Arg			
SMHi23 H	32		Leu			Ile			Asn			
SMHi4 H	>128		Leu	Asn					Asp			

(3-1) 非常に軽度な感受性低下株(MFLX 添加培地で得られた最終段階変異株のMFLX MIC = 0.06 mg/L)では、GyrA, ParCにQRDR変異がみられず、GyrBに単独の変異がみられた。過去の臨床分離株の検討でも同様の報告があり、その変異部位も一致していた(Thr472Ile)(参考-4)。なお、GyrBのSer467Tyr変異によるキノロン感受性低下は*Pseudomonas aeruginosa*で報告がある(参考-5)。これらの変異株の出現頻度は10⁻⁹であった。

(3-2) 軽度の感受性低下がみられた株(MFLX 添加培地で得られた最終段階変異株のMFLX MIC = 0.5 mg/L)では、GyrAに単独の変異がみられた。これらの変異株の出現頻度は10⁻⁹であった。

(3-3) 中程度の感受性低下がみられた株(MFLX 添加培地で得られた最終段階変異株のMFLX MIC = 1-8 mg/L)では、軽度の感受性低下がみられた株と同様に、GyrAに単独の変異がみられたが、これらの変異株の出現頻度は10⁻⁶~10⁻⁸と高い値であった。

(3-4) 感受性低下が強い株(MFLX 添加培地で得られた最終段階変異株のMFLX MIC = 16 mg/L以上)では、ParCやGyrA、もしくは両方の変異がみられた。これらの変異株の出現頻度は10⁻⁶~10⁻⁸と高い値であった。

以上のGyrA, ParCの変異と感受性低下の相関は過去の臨床分離株での報告に類似していた(参考1-5)。しかし、最終変異株が得られる各段階において、QRDRの変異がなくMFLX MICの上昇がみられる段階が認められた。これらは未知のキノロン耐性機構が示唆される。本研究での実験系から外来遺伝子の獲得は否定できるため、染色体遺伝子変異などの何らかの内因性的変化が起きていると考えられた。これらについては、今後も解析をしていく考えである。また、非感受性(MFLX MICが2mg/L以上)に至らない感受性低下株は、非感受性を示す株と比較して、QRDRの遺伝子変異頻度が低い傾向にあった。さらにBLNARがBLNAS, BLPARに比較して有意にキノロン非感受性株の出現頻度が高かった。BLNARはPenicillin-binding protein-3(PBP-3)にアミノ酸を伴う変異が起こることでABPCに耐性を示す。つまり、我々の研究では、キノロン耐性を獲得するリスクのある菌株はPBP3にも変異を伴っている菌株であり、将来的にキノロン-ラクタム系抗菌薬耐性*H. influenzae*が出現・拡大する危険性を危惧する結果となった。*H. influenzae*のQRDR遺伝子変異を起こす株はhypermutableであるとの報告もあり(参考-4)、遺伝的特徴を含め今後検討が必要である。

<参考文献>

- 1 Shu-Chen kuo et al. Emerging Infectious Diseases 2014,8:1386-1390
- 2 Yokota S et al. J Clin Microbiol 2008,1:361-365
- 3 Puig et al. Antimicrob. Agents Chemother 2015,1:461-466
- 4 Maria Perez-Vazquez et al. Antimicrob. Agents Chemother 2007,4:1566-1569
- 5 Xiaoyan Yang et al. Int J Clin Exp Med 2015,1:1386-1390

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)

[雑誌論文](計 3 件)

Sato T, Suzuki Y, Shiraishi T, Honda H, Shinagawa M, Yamamoto S, Ogasawara N, Takahashi H, Takahashi S, Tamura Y, Yokota SI. Tigecycline Nonsusceptibility Occurs Exclusively in Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* Clinical Isolates, Including the Major Multidrug-Resistant Lineages O25b:H4-ST131-H30R and O1-ST648. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Jan 24;61(2). pii: e01654-16. doi: 10.1128/AAC.01654-16. (査読有)

Ohkoshi Y, Sato T, Suzuki Y, Yamamoto S, Shiraishi T, Ogasawara N, Yokota SI. Mechanism of Reduced Susceptibility to Fosfomycin in *Escherichia coli* Clinical Isolates. BioMed Research International 2017, Article ID 5470241, 8 pages doi: 10.1155/2017/5470241

Sato T, Fukuda A, Suzuki Y, Shiraishi T, Honda H, Shinagawa M, Yamamoto S, Ogasawara N, Usui M, Takahashi H, Takahashi S, Tamura Y, Yokota S. Pathogenic Lineage of *mcr*-Negative Colistin-Resistant *Escherichia coli*, Japan, 2008-2015. Emerg. Infect. Dis. 2016. Dec;22(12):2223-222. doi: 10.3201/eid2212.161117. (査読有)

[学会発表](計 6 件)

本田宏幸、佐藤豊孝、高橋弘毅、横田伸一. *Haemophilus influenzae* のキノロン系抗菌薬耐性獲得機序についての検討. 第 91 回日本感染症学会総会・第 65 回日本化学療法学会学術集会合同学会. 京王プラザホテル(東京都新宿区). 2017 年 4 月 7 日～8 日

佐藤豊孝、品川雅明、高橋聡、横田伸一. 大腸菌臨床分離株におけるフルオロキノロン

系抗菌薬耐性とチゲサイクリン耐性との関連性. 第 91 回日本感染症学会総会・第 65 回日本化学療法学会学術集会合同学会. 京王プラザホテル(東京都新宿区). 2017 年 4 月 7 日～8 日

鈴木裕樹、佐藤豊孝、山本聡、小笠原徳子、白石宗、品川雅明、高橋聡、横田伸一. タゾバクタム/ピペラシリン耐性大腸菌の耐性機構の解析. 第 90 回日本細菌学会総会. 仙台国際センター展示棟(宮城県仙台市). 2017 年 3 月 19 日～21 日

佐藤豊孝、鈴木裕樹、山本聡、小笠原徳子、白石宗、品川雅明、高橋聡、田村豊、横田伸一. 大腸菌臨床分離株におけるフルオロキノロン系抗菌薬耐性とチゲサイクリン耐性との関連性. 第 45 回薬剤耐性菌研究会. 安芸グランドホテル(広島県廿日市市). 2016 年 10 月 21 日～22 日

鈴木裕樹、佐藤豊孝、山本聡、小笠原徳子、白石宗、品川雅明、高橋聡、横田伸一. タゾバクタム/ピペラシリン耐性大腸菌の耐性機構の解析. 第 45 回薬剤耐性菌研究会. 安芸グランドホテル(広島県廿日市市) 2016 年 10 月 21 日～22 日

佐藤豊孝、鈴木裕樹、山本聡、小笠原徳子、白石宗、品川雅明、高橋聡、田村豊、横田伸一. 大腸菌臨床分離株におけるフルオロキノロン系抗菌薬耐性とチゲサイクリン耐性との関連性. 第 10 回細菌学若手コロッセウム. 草津セミナーハウス(群馬県草津市). 2016 年 7 月 31 日～8 月 2 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

アメリカ微生物学会 (ASM) Young
Ambassador of Science 2017 に選任：
<https://www.asm.org/index.php/who-we-are/ambassadors>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 豊孝 (SATO TOYOTAKA)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：30756474

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()