

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究 B

研究期間：2011～2012

課題番号：23791756

研究課題名（和文） 尿路感染症由来緑膿菌臨床株の薬剤耐性機構とその迅速診断法の研究

研究課題名（英文） The drug-resistant mechanism and rapid detection of the *Pseudomonas aeruginosa* derived from urinary tract infection研究代表者 松本 穰 (MATSUMOTO MINORI)
神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40533774

研究成果の概要（和文）：

尿路感染症起因緑膿菌の臨床株について、フルオロキノロン系抗菌薬の標的酵素である *gyrA/B*、*parC/E* 遺伝子のキノロン耐性決定領域（Quinolone Resistance-Determining Region: QRDR）におけるアミノ酸の遺伝子変異と最小発育阻止濃度（Minimum inhibitory concentration: MIC）の相関について、また *efflux pump* に関わる遺伝子の発現亢進と各系統抗菌薬の MIC との関連性についてそれぞれ検討する。また遺伝子変異、遺伝子発現亢進と患者の臨床的データとの相関を調べ、さらにはそれら遺伝子変異、遺伝子発現亢進の迅速診断法の確立について研究する。

研究成果の概要（英文）：

Pseudomonas aeruginosa has some mechanisms of multi-drug resistance, including efflux pump system and amino acid mutation related to the drug resistance. We investigate the molecular biological mechanism of resistance to antibiotics, and seek for the rapid detection of the resistance. A hundred and fourteen strains of *P. aeruginosa* isolated from UTI patients were used in this study. Genomic DNA from each strain was subjected to PCR amplification of 225 bp in *gyrA* and 166 bp in *ParC* spanning QRDRs. After we performed DNA sequencing of these amplicons and identification of mutations in the QRDRs, DHPLC was undertaken to investigate whether its results correlate the distinctive chromatogram with their DNA mutations pattern. In terms of efflux pump system in *Pseudomonas aeruginosa*, I examined the evaluation of the RNA frequency in the representative protein (*mexB*, *mexC*, *mexE*, *mexY*, *mexA*) related to efflux pump and the relationship with the drug resistance using technique of the quantitative real-time PCR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	250000	750000	3250000

研究分野：尿路感染症

科研費の分科・細目：若手研究 B

キーワード：緑膿菌、抗菌薬耐性、迅速診断法

1. 研究開始当初の背景
感染症治療において、抗菌薬が多用されるにつれて、薬剤耐性菌の問題が深刻になってき

ている。泌尿器科領域では、尿路感染症の治療にフルオロキノロン系抗菌薬が頻繁に使用されてきたが、近年ではこれらの薬剤に対

しても耐性菌の増加が多く報告されており、臨床的にも問題になっている。特に、緑膿菌の耐性化については数多くの報告があり、従来より各種抗菌薬に耐性を示す傾向が強いと言われている。薬剤耐性機構に関しては、修飾酵素による薬剤の抗菌活性の低下、薬剤排出機構 (efflux pump) の機能亢進、染色体性遺伝子による DNA gyrase との結合阻害、などが報告されている。フルオロキノロン系抗菌薬に対しては標的酵素の遺伝子変異が耐性化の大きな関連因子であるといわれている。さらにこれらの抗菌薬耐性を短時間で同定し推測できる迅速診断法が幾つか確立されつつある。当研究グループでは、このような薬剤耐性機構に関して、他菌種ではあるが、基礎的なアプローチを行い、検討を重ねてきた実績がある。この成果を踏まえ、本研究では尿路感染症起因緑膿菌の耐性メカニズムの解明に着手する予定である。緑膿菌は尿路感染症の主たる原因菌の一つであり、昨今問題視されている多剤耐性の緑膿菌は、メチシリン耐性ブドウ球菌

(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) に比べ報告例は少ないが、既に第5類定点把握疾患に指定されており、全国規模での院内感染対策を施行する事が急務である。

2. 研究の目的

尿路感染症由来緑膿菌の抗菌薬耐性に関して、薬剤排出ポンプ・耐性関連遺伝子を用いて種々の抗菌薬への耐性と関連について検討する。すなわち抗菌薬耐性の分子生物学的メカニズムについて検討する。さらには、抗菌薬耐性への迅速診断法の確立を検討する。現在多剤耐性緑膿菌など耐性化が進む中、尿路感染症、特に尿路に基礎疾患を有する複

雑性尿路感染症の治療法が複雑多岐にわたってきており、その背景の中で今後の耐性化を食い止める研究となることが目的である。

3. 研究の方法

尿路感染症起因緑膿菌の臨床株について、フルオロキノロン系抗菌薬の標的酵素である gyrA/B、parC/E 遺伝子のキノロン耐性決定領域 (Quinolone Resistance-Determining Region: QRDR) におけるアミノ酸の遺伝子変異と最小発育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration: MIC) の相関について、また efflux pump に関わる遺伝子の発現亢進と各系統抗菌薬の MIC との関連性についてそれぞれ検討する。また遺伝子変異、遺伝子発現亢進と患者の臨床的データとの相関を調べ、さらにはそれら遺伝子変異、遺伝子発現亢進の迅速診断法の確立について研究する。

4. 研究成果

①キノロン系抗菌薬は幅広い抗菌スペクトルを有し、優れた抗菌作用を持つ。その機序は細菌のDNA複製に関与するDNAgyraseとIV型topoisomeraseを阻害する事である。この同系薬の耐性機序として、標的酵素の遺伝子変異があげられる。同系薬の標的酵素であるDNAgyraseとIV型topoisomeraseはそれぞれ2つのsub-unit、gyraseA/B、parC/Eから構成されている。本研究ではこれらgyraseA/B、parC/Eのキノロン耐性決定領域 (Quinolone Resistance-Determining Region: QRDR) でのシークエンスを行い、アミノ酸配列を決定した。さらにwild typeとの比較によりアミノ酸変異を有する株を同定し、アミノ酸配列を決定した。また、その中からアミノ酸変異を有する株を同定し、MICとの関連を検討した。また抗菌薬交差耐性を見るため他系抗菌薬に対するMICも測定し上記の変異との関連

を見た。

さらに、これら変異の中で有意にMICを動かし得る変異を同定し、この変異を臨床的risk factor (複雑性尿路感染症、性別、フルオロキノロン系などの抗菌薬使用歴など)との相関についても検討した。

②キノロン系抗菌薬の耐性について、QRDRの段階的変異の蓄積が高度耐性化に関係しているとされている。これらの遺伝子変異を迅速に診断方法として、Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)法を行った。これは、変異型DNAを含む場合には、2種のホモ二本鎖分子と2種のヘテロ二本鎖分子がそれぞれ異なる時間で溶出され、2つ以上のピークを示す事で変異を感知する。一度に比較的広範な領域(数百bp)における既知および未知の変異の有無について検出でき、非常に簡便で低コストであるため、スクリーニング検査として有用と考えられた。

③緑膿菌におけるefflux pumpの機能亢進について、定量的real-time RT-PCRの手法を用いて、efflux pumpを構成する代表的な蛋白(mexB, mexC, mexE, mexY, muxA)をcodeするRNAの発現頻度の評価、および薬剤耐性との関係性について検討した。

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1件)

Mutations in the gyrA and parC genes and in vitro activities of fluoroquinolones in 114 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* derived from urinary tract infections and their rapid detection by denaturing high-performance liquid

chromatography.

Int J Antimicrob Agents.

2012Nov;40(5):440-4.

Matsumoto M, Shigemura K, Shirakawa T, Nakano Y, Miyake H, Tanaka K, Kinoshita S, Arakawa S, Kawabata M, Fujisawa M.

[学会発表] (計3件)

1. Rapid detection of the gyrA and parC mutations in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain by denaturing high-performance liquid chromatography in UTI patients in Japan
The107thAUA (AmericanUrological Association)
Annual Meeting (2013 5/4-8 San Diego, USA)
2. Rapid detection of the gyrA and parC mutations in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain by denaturing high-performance liquid chromatography in UTI patients in Japan
Annual European Association of Urology Congress (2012 2/24-28 Paris, France)
3. Rapid detection of the gyrA and parC mutations in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain by denaturing high-performance liquid chromatography in UTI patients in

Japan
the 28th Korea-Japan Urological
Congress (2011 9/16-17 Korea)

4. 尿路感染症由来緑膿菌臨床株における
高速液体クロマトグラフィーによる
フルオロキノロン系抗菌薬耐性の迅速
診断法確立への検討
第99回日本泌尿器科学会総会 (2011
4/22 名古屋)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 穰 (マツモト ミノリ)

神戸大学医学部附属病院 医員

研究者番号：40533774