

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462455

研究課題名(和文) 尿路病原性大腸菌の薬剤排出ポンプ機能の阻害によりキノロン耐性誘導を阻止する

研究課題名(英文) Prevention of induction of quinolone-resistance by inhibition of drug efflux pump in uropathogenic *E. coli*

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：キノロン感受性尿路病原性大腸菌株からキノロン高度耐性を得た。耐性株においては元株にはなかったQRDRのgyrA、parC、parEなどに遺伝子変異がみられた。薬剤排出ポンプ関連蛋白のmRNA発現レベルを比較したところ、marAにおいては100～1000倍と顕著な増加を示した。

さらに大腸菌にキノロン耐性を誘導すると、8～32倍のセフェム系抗菌薬に対する耐性も同時に誘導されていることが確認された。セフェム系抗菌薬に対する耐性誘導のメカニズム解明のため、元株および対象菌株のホールゲノムシーケンスを行い、キノロン系およびセフェム系耐性の誘導に關与する遺伝子の同定を進めている。

研究成果の概要(英文)： We induced developed fluoroquinolone-resistant strains by the exposure to fluoroquinolone, followed by the final development of high-resistant isolates. In the developed fluoroquinolone-resistant isolates, additional mutations were found in gyrA, parC and parE. Further, quantitative analysis of mRNA expression of efflux pumps and their regulators expression revealed remarkable increase of marA expression, which is a positive regulator of efflux pump.

Another interesting finding was that these developed fluoroquinolone-resistant *E. coli* strains showed resistance against several cephalosporin as 8 to 32 times higher MIC than the original strains. We have started the whole-genome sequence of these strains to find the mutation which are different from their original strains.

研究分野： 尿路感染症

キーワード： 尿路病原性大腸菌 キノロン耐性 セフェム耐性 薬剤排出ポンプ シークエンス

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。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12%、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、キノロン耐性が誘導される機序の解明すること、そして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。

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 (Singh et al. Antimicrob Agent Chemother, 2011) 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

最近我々は、キノロン感受性大腸菌株がキノロン耐性を誘導する過程において、LVFX 耐性が高度になるにつれて薬剤排出ポンプ調整蛋白 *marA*、*mdfA*、*acrB*、*tolC*、*sdiA* の mRNA の高発現が認められていることを見出した。

本研究は当初、

(1)上記の現象の再現性を確認すること、
(2)さまざまな併用抗菌薬の組み合わせによる抗菌活性により、有効に薬剤排出ポンプを抑制する物質を同定すること。

を目的としていた。

(1)については、順調に追加実験も終了し、論文報告を行うにいたった。(2)については理想的な物質を同定するにいたらなかった。しかしながら、(1)のデータを再確認していくうちに、大腸菌にキノロン耐性を誘導すると、セフェム系抗菌薬に対する耐性も同時に誘導されていることが確認された。そのため、一部研究方針を変更し、

(3)キノロン耐性誘導に伴うセフェム系抗菌薬に対する耐性誘導のメカニズム解明のため、元株およびキノロン耐性菌株のホールゲノムシーケンスを行い、キノロン系およびセフェム系耐性の誘導に関与する遺伝子の同定すること、
を目的とした。

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 µg/ml) 尿路病原性大腸菌から誘導された LVFX 中等度~高度耐性菌とそれらの元株の 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。

(2) BC プレート (栄研) を用いて、上記で得られたキノロン感受性～高度耐性大腸菌株に対して、さまざまな併用抗菌薬の組み合わせによる抗菌活性を評価した。

(3) 元株およびキノロン耐性が誘導された株を対象に、17 株すべてに対してバルフィールドを施行することにより、元株とキノロン耐性誘導株が間違いなく同じクローンであることも検証した。さらに 30 種類以上の抗菌薬に対する感受性を網羅的に調べ、キノロン耐性が誘導された大腸菌株にセフェム系をはじめ様々な抗菌薬に対する耐性も同時に誘導されていることが確認された。そこで、キノロン系およびセフェム系耐性の誘導に関与する遺伝子の同定するため、元株およびキノロン耐性菌株のホールゲノムシーケンスを行った。

4. 研究成果

(1) キノロン感受性尿路病原性大腸菌株 89 株を LVFX0.5 ~ 8 $\mu\text{g/ml}$ 、4 ~ 64 $\mu\text{g/ml}$ 、32 ~ 28 $\mu\text{g/ml}$ 含有アガー培地で継代培養し、そのうち 5 株から中等度耐 (4 ~ 32 $\mu\text{g/ml}$) さらに 2 株の高度耐性 (128 $\mu\text{g/ml}$) を得た。薬剤排出ポンプ関連蛋白および quorum sensing 調整蛋白の mRNA 発現レベルを比較したところ、marA においては 100 ~ 1000 倍と顕著な増加を示した。これらのキノロン耐性株はすでに元株において 1~2 ヶ所の QRDR 遺伝子変異を保有していたが、128 $\mu\text{g/ml}$ 耐性

株においては元株にはなかった QRDR の遺伝子変異がみられた。

(2) FP4 $\mu\text{g/ml}$ ・CPFX 1 $\mu\text{g/ml}$ それぞれ単独では耐性を示した菌株 (Uec314・R2) が RFP2 $\mu\text{g/ml}$ ・CPFX 1 $\mu\text{g/ml}$ 併用で感受性を示した。同様に RFP4 $\mu\text{g/ml}$ ・CPFX 2 $\mu\text{g/ml}$ それぞれ単独では耐性を示した菌株 (Uec314・R8) が RFP4 $\mu\text{g/ml}$ ・CPFX 2 $\mu\text{g/ml}$ 併用で感受性を示した。その他の抗菌薬では、明らかなキノロン製剤との併用による抗菌活性の増幅効果は見られなかった。

(3) キノロン耐性が誘導された大腸菌株にセフェム系をはじめ様々な抗菌薬に対する耐性も同時に誘導されていることが確認された。多くの株はペニシリン系、第 1~3 セフェム系に対して 4~8 倍の耐性を示す程度であるが、CMZ にいたっては元株の 16~32 倍の耐性をしめす株も採取された。元株および対象菌株のホールゲノムシーケンスを行ったところキノロン耐性またはセフェム耐性を獲得するにつれて、acrB および soxC などの遺伝子に複数の遺伝子変異が認められた。現在 17 株のうち約半数の株についてのホールゲノムシーケンスを進めている。

(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の高発現は、キノロンおよびセフェム系薬の排出に関わっていると考えられている AcrA, AcrB, TolC 系の制御遺伝子に変異を獲得することに支えられており、それにともないセフェム耐性も同時に獲得

していることが示唆された。

今後はこれらのデータを再確認すること、および人為的に同じ変異を挿入することで同様に薬剤排出ポンプの高発現がえられるかなどの再現をすすめていきたい。薬剤排出ポンプまたは quorum sensing を阻害するなどの方法を開発することで、キノロンおよびセフェム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が可能であると考え。

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)

Yamasaki E, Yamada C, Jin X, Nair GB, Kurazono H, Yammaoto S: Expression of *marA* is remarkably increased from the early stage of development of fluoroquinolone-resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. **J Infect Chemother** 21:105-109, 2015
(査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

山本新吾、呉 秀賢、東郷容和、鈴木透、兼松明弘、野島道生：大腸菌キノロン耐性獲得における薬剤排出ポンプ蛋白の重要性。第 79 回日本泌尿器科学会 東部総会 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) 2014.10.12-14 (10.14)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 新吾 (YAMAOTO, 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

山崎 栄輝 (YAMASAKI, Eiki)
帯広畜産大学・畜産学部・助教
研究者番号：40514708

東郷 容和 (TOGO, Yoshikazu)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：20611370

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし