

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890141

研究課題名（和文） 大腸菌の臨床株の efflux pump 遺伝子発現と抗菌薬耐性の相関

研究課題名（英文） Correlation of Overexpression of Efflux Pump Genes with Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Strains Clinically Isolated from Urinary Tract Infection Patients研究代表者 安福 富彦 (YASUFUKU TOMIHIKO)
神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員
研究者番号：10533771

研究成果の概要（和文）：大腸菌の薬剤耐性に関わる薬剤排出ポンプ遺伝子の発現量と、各種抗菌薬耐性の関連について検討した。大腸菌 64 株について、薬剤排出ポンプ遺伝子の RNA 発現の相対定量を行い、RNA 発現量と各種抗菌薬耐性の相関について統計解析を行った。結果は、薬剤排出ポンプ遺伝子の高発現とフルオロキノロン系抗菌薬に対する耐性の間に相関を認め、薬剤排出ポンプ遺伝子の発現が、フルオロキノロン系抗菌薬に対する耐性獲得に関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Efflux system overexpression is reported to contribute to *Escherichia coli* resistance to several antibiotics. This study investigated the correlation of antibiotic susceptibilities with overexpression of the efflux pump genes. We examined the expression level of efflux pump genes of *E. coli*. Significant relationships were demonstrated between overexpression of efflux pump genes and antibiotic resistance. This study demonstrated that increased expression of efflux pump genes can lead to fluoroquinolone resistance in *E. coli* causative UTI. These results contribute to our knowledge of the efflux system and raise the possibility of developing new agents such as efflux pump inhibitors (EPIs) to antibiotic-resistant *E. coli*.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 1,050,000 | 315,000 | 1,365,000 |
| 2010 年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 1,650,000 | 495,000 | 2,145,000 |

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：薬剤排出ポンプ、大腸菌、抗菌薬耐性

1. 研究開始当初の背景

尿路感染症 (urinary tract infection: UTI) の主たる原因菌である大腸菌において、フルオロキノロン系抗菌薬耐性の増加が、昨今、問題となっている。当院では、毎年、大腸菌の感受性率の調査を行っている。2000年には尿中分離大腸菌の3.5%が levofloxacin (LVFX) 耐性であったが、2003年には11.5%、2007年には30.8%と、大腸菌のLVFX耐性率の顕著な増加を認めた。

フルオロキノロン系抗菌薬耐性獲得の機序としては、フルオロキノロン系抗菌薬の標的酵素である *gyrA*, *parC* における遺伝子変異、薬剤排出ポンプの機能亢進、プラスミド性遺伝子による DNA gyrase との結合阻害、修飾酵素による薬剤の抗菌活性の低下などが報告されているが、薬剤排出ポンプの機能亢進は、フルオロキノロン系抗菌薬だけでなく、その他の多種類の抗菌薬を排出し、その薬剤感受性の低下に関与しているとされている。薬剤排出ポンプは、その構造上の特徴から Major Facilitator Superfamily (MFS), Resistance-Nodulation-Division Family (RND), ATP-Binding Cassette Family (ABC) の3種類に大別されるが、とくに薬剤耐性に関しては、RNDが中心的な役割を演じている。大腸菌における代表的な薬剤排出ポンプとしては、RNDに属するA crAB-TolC, YhiUV、MFSに属するMdfAなどがあるが、A crAB-TolCのregulatorは、*marA* 遺伝子であり、また、YhiUVを構成する蛋白は *yhiU*, *yhiV* 遺伝子により、MdfAを構成する蛋白は *mdfA* 遺伝子によって、codeされている。

2. 研究の目的

対象は、2008年4月より7月までに尿路感

染症患者の尿中より分離された大腸菌64株で、尿路基礎疾患の有無、LVFXに対する耐性の有無別に4つのグループに分類した。

marA, *yhiU*, *yhiV*, *mdfA* 遺伝子について、それぞれの遺伝子の発現定量を行い、薬剤排出ポンプ遺伝子の発現量と、フルオロキノロン系抗菌薬をはじめとする各種抗菌薬に対する耐性との相関、抗菌薬耐性化のリスク因子との相関、尿路基礎疾患の有無、LVFX耐性の有無別に分けた4グループとの相関について、統計学的解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

piperacillin (PIPC)、cefazolin (CEZ)、ceftazidime (CAZ)、cefepime (CFPM)、amikacin (AMK)、gentamicin (GM)、imipenem (IPM)、minocycline (MINO)、nalidixic acid (NA)、ciprofloxacin (CPF), LVFX、sitafloxacin (STFX) の、12種類の各種抗菌薬について、Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelineに基づいて、最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) の測定を行った。

大腸菌より total genome mRNA を抽出し、薬剤排出ポンプを構成する蛋白を code する *marA*, *yhiU*, *yhiV*, *mdfA* 遺伝子の mRNA について、quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (定量的 RT-PCR) による相対定量を行った。相対発現量は、目的遺伝子の発現量を、内在性コントロールである *gapA* の発現量で除したものとした。また、Keeneyらの報告に基づき、標準株の2倍以上のRNA発現量を示した株を、高発現株と定義した。薬剤排出ポンプ遺伝子の発現量と各種抗菌薬耐性との相関、各グループとの相関について、統計解析ソフトである STATA を用いて、多変量解析

(multivariate logistic regression analysis) を行った。

また、各種抗菌薬に対する耐性化のリスク因子として、①高齢、②性別、③尿路基礎疾患の有無、④尿路カテーテルの有無、⑤フルオロキノロン系抗菌薬の使用歴、⑥フルオロキノロン系以外の抗菌薬の使用歴、⑦入院の有無、⑧泌尿器科患者であるか否かを設定し、リスク因子と薬剤排出ポンプ遺伝子の高発現の相関、または各種抗菌薬耐性の相関について、統計学的に解析を行った。

4. 研究成果

12種類の抗菌薬について、薬剤感受性の測定を行ったところ、IPM、AMKに耐性を持つ株は認めなかった。相対定量の結果、今回に検討した64株中、*marA*、*yhiU*、*yhiV*、*mdfA*遺伝子が高発現を示したものは、それぞれ52株(81.3%)、23株(35.9%)、17株(26.6%)、22株(34.4%)であった。*marA*、*yhiU*、*yhiV*、*mdfA*遺伝子の中央値は、それぞれ25.82、1.31、0.91、1.40であった。

多変量解析の結果、薬剤排出ポンプ遺伝子の高発現と各種抗菌薬に対する耐性の相関についての検討では、1) *marA* 遺伝子の高発現とCFPM、NAのMIC、2) *yhiV* 遺伝子の高発現とMINOのMIC、3) *mdfA* 遺伝子の高発現とSTFXのMICの間に有意な相関を認めた。薬剤排出ポンプ遺伝子の高発現とリスク因子の相関についての検討では、*marA* 遺伝子の高発現と、性別が女性であること、あるいは、フルオロキノロン系抗菌薬の使用歴の間に有意な相関を認めた。また、*mdfA* 遺伝子の高発現と、尿路カテーテルが留置された症例の間に有意な相関を認めた。結論としては、薬剤排出ポンプに関連する遺伝子として、*marA* 遺伝子の高発現とNA耐性、*mdfA* 遺伝子の高発

現とSTFX耐性の相関を認め、*marA*、*mdfA* 遺伝子の高発現が、フルオロキノロン系抗菌薬耐性に関連している可能性が示唆された。

また、薬剤排出ポンプの相対発現量と各グループの相関について検討を行ったところ、*marA* 遺伝子の相対発現量は、複雑性UTIでLVFX耐性を認めるグループと、複雑性、あるいは単純性UTIでLVFX耐性を認めないグループの間に有意差を認め、複雑性UTIにおいて、*marA* 遺伝子の高発現とLVFX耐性が相関している可能性が示唆された(図1)。

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)

①Tomihiko Yasufuku, Katsumi Shigemura, Toshiro Shirakawa, Minori Matsumoto, Yuzo Nakano, Kazushi Tanaka, Soichi Arakawa, Shouhiro Kinoshita, Masato Kawabata, and Masato Fujisawa

Correlation of Overexpression of Efflux Pump Genes with Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Strains Clinically Isolated from Urinary Tract Infection Patients

Journal of Clinical Microbiology 2011 Jan 49(1):189-94.

[学会発表] (計 3件)

①第84回 日本感染症学会(口演)

尿路感染症由来大腸菌の臨床株における薬剤排出ポンプ遺伝子の発現と各種抗菌薬耐性との関連の解析 (2010.4.5、京都)

②第98回 日本泌尿器科学会(総会賞応募ポスター)

尿路感染症由来大腸菌の臨床株における
薬剤排出ポンプ遺伝子の発現と各種抗菌薬
耐性との関連の解析 (2010. 4. 28、東京)

③American Urological Association meeting

Correlation of overexpression of efflux
pump genes with antibiotic resistance in
Escherichia coli strains clinically
isolated from urinary tract infection
patients (2011. 5. 16、Washington DC)

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

特にございません

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安福 富彦 (YASUFUKU TOMIHIKO)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号：10533771

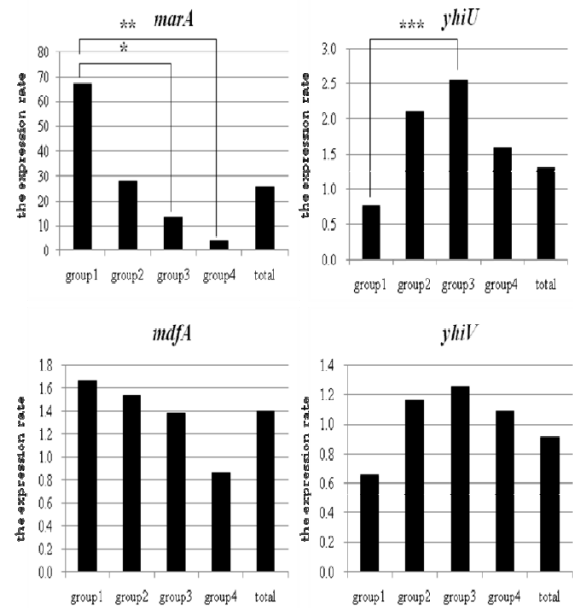
(2) 研究協力者

重村 克巳 (SHIGEMURA KATSUMI)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号：00457102

図 1



Wilcoxon rank sum test: **P*-値 = 0.002、***P*-値 = 0.001、****P*-値 = 0.004

グループ 1 (29 株): 尿路基礎疾患あり (複雑性UTI)、LVFX耐性あり

グループ 2 (9 株): 尿路基礎疾患なし (単純性UTI)、LVFX耐性あり

グループ 3 (16 株): 尿路基礎疾患あり (複雑性UTI)、LVFX耐性なし

グループ 4 (10 株): 尿路基礎疾患なし (単純性UTI)、LVFX耐性なし