

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

【序論】

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) はグラム陰性好気性桿菌で、わずかの有機物と水分が存在すれば増殖でき、土中、水中など、広く自然界に分布し、ヒトの皮膚、腸管内にも存在する。また、外毒素やムコイドの産生、様々な抗菌薬に対する自然耐性という特徴を持つ。

東邦大学医療センター大橋病院において、各種抗菌薬の投与期間が長期にわたる症例が存在している。このことはこれまで報告されている薬剤耐性菌株の出現を示唆するものであるが、臨床分離株における薬剤耐性機構などの詳細は不明である。

緑膿菌の強力な薬剤耐性機構は、プラスミドを介した外因性の耐性機構と既存の遺伝子の変異による内因性の耐性機構に大別される。本研究では、東邦大学医療センター大橋病院で分離されたフルオロキノロン系抗菌薬耐性緑膿菌における薬剤耐性とその耐性メカニズムの1つといわれる“標的蛋白の変異”や“薬剤排出ポンプの機能亢進”との関連を明らかにする。本研究では、フルオロキノロン系抗菌薬の標的蛋白をコードする *gyrA*、*parC* の遺伝子と薬剤排出ポンプの機能亢進の調節に関与すると考えられる *mexR*、*mexZ*、*nfxB* の遺伝子について塩基配列を決定し、アミノ酸配列の変異の有無を確認することで薬剤耐性との関連を検討した。“薬剤排出ポンプの機能亢進”による薬剤耐性については、排出ポンプ阻害剤を用いることで薬剤排出ポンプの過剰発現を検討した。

また、同一患者より得られた分離株の経時的な薬剤耐性の推移を見ることで抗菌薬投与と薬剤耐性の関係を検討し、初期に分離された分離株の変異頻度を測定し、薬剤耐性の出現に変異頻度の高い菌株 (Hypermutable strain) の関与を検討した。

【方法】

薬剤感受性試験は寒天培地希釈法を用い、使用薬剤に対する感受性の判定は、感染症新法での「多剤耐性緑膿菌」の判定基準である (1) カルバペネム系抗菌薬の MIC 値 16 μ g/mL 以上 (2) アミノグリコシド系抗菌薬の MIC 値 32 μ g/mL 以上 (3) フルオロキノロン系抗菌薬の MIC 値 4 μ g/mL 以上 を参考にした。

薬剤耐性機構の確認には、緑膿菌のキノロン標的分子である II 型トポイソメラーゼを構成する GyrA・ParC のアミノ酸変異の有無と、薬剤排出ポンプの機能亢進に関わる遺伝子として MexZ、MexR、NfxB のアミノ酸変異の有無を調査した。また、薬剤排出ポンプ調節遺伝子の変異が薬剤排出ポンプの過剰発現に関わり、このことがキノロンの耐性に関与していることを確認するために efflux pump inhibitor (EPI) として phenylalanine arginyl β -naphthylamide を用いて、EPI 添加の有無による CPF_X の MIC 値の変化の検討を行った。

また、同一患者から得られた複数の緑膿菌の由来を ERIC PCR にて確認した。

【結果・考察】

1. 緑膿菌臨床分離株の薬剤感受性

シプロフロキサシン (以下 CPF_X) の MIC 値の分布は、外来患者由来の菌株では、1 菌株を除いて 0.06

未満から 1.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、入院患者由来の菌株では 0.06 未満から 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の範囲であった。以下同様に、パズフロキサシン（以下 PZFX）の外來患者由来の菌株では 0.06~7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、入院患者由来の菌株では 0.06 未満~62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、メロペネムの外來患者由来の菌株では 0.49 未満~7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、入院患者由来の菌株では 0.49 未満~125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、アミカシンの外來患者由来の菌株では 0.49 未満~15.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、入院患者由来の菌株では 0.49 未満~62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲であった。外來患者由来の菌株はほぼ全てが薬剤感受性であるのに対し、入院患者由来の菌株では 321 株中 132 株が今回調査したいずれかの抗菌薬に対し耐性を示した。これは、長期にわたり多種多様の抗菌薬の投与により耐性菌が選択された、あるいは標的組織内の薬物濃度が不十分なために、変異による耐性菌が出現したことが考えられる。

2. 緑膿菌臨床分離株の薬剤耐性機構

臨床分離株 373 株のうち、CPFX または PZFX の MIC 値が 3.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の菌株、あるいは同一患者から複数回検出された菌株、計 135 株の *gyrA*、*parC* の塩基配列を決定し、緑膿菌の標準株の配列と比較することで変異の有無を調べた。

GyrA に関しては、Thr83Ile の変異株が 61 株、Asp87Asn の変異株が 7 株、Asp87Gly の変異株が 3 株存在した。*ParC* に関しては、Ser87Leu の変異株が 12 株存在した。*GyrA*、*ParC* ともに変異のない菌株では、そのほとんどがキノロン感受性株であったが、*GyrA* あるいは *GyrA* と *ParC* の両者の変異により耐性度が高くなることが確認された。更に、*GyrA* の Thr83Ile の変異によりキノロン高度耐性となり、Asp87Asn や Asp87Gly の変異は低度耐性に関与していることが示された。また、*GyrA*、*ParC* のいずれにも変異がないにもかかわらず MIC 値が 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上を示す高度耐性株の存在も明らかとなった。大腸菌やクロストリジウム・ディフィシル、結核菌では *gyrB* の変異によるキノロン耐性、さらにサルモネラ菌では *gyrB* に加え *parE* の変異によるキノロン耐性も報告されていることから、緑膿菌においても同様の変異によるキノロン耐性の可能性も考えられる。

つぎに、薬剤排出ポンプの機能亢進に関わる遺伝子として *mexZ*、*mexR*、*nfxB* についても変異の有無を調査した。薬剤排出ポンプの発現制御に関わる遺伝子、*mexZ*、*mexR*、*nfxB* の変異により排出ポンプの過剰発現が起こり、薬剤に対する耐性度が高まることが推定される。本研究で調べた限りでは、*gyrA*、*parC* に変異がなく、*mexZ* 単独あるいは *mexZ* と *mexR* に変異を持つ菌株ではキノロン高度耐性は見られなかった。また、*nfxB* のみに変異のある菌株は認められず、*nfxB* に変異のある株では、*gyrA*、*parC*、*mexR* あるいは *mexZ* にも変異のある株であった。*gyrA*、*parC* の変異と薬剤排出ポンプ調節遺伝子に変異が存在する菌株では、変異遺伝子が多くなるにつれてキノロンの MIC 値は高く、高度のキノロン耐性を獲得していることが確認された(表 1)。

キノロン標的分子の変異に加え薬剤排出ポンプ調節遺伝子の変異が重なることで、キノロン高度耐性となることが示唆されたが、実際に薬剤排出ポンプが過剰発現していることを確認するために、efflux pump inhibitor (EPI) として phenylalanine arginyl β -naphthyl- amide を用いて、EPI 添加による CPFX の MIC 値の変化を調べた。

CPFX の MIC 値が 3.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の 66 株のうち EPI の添加によって MIC 値が 1/8 以下に低下した菌株は 12 株であった。その中で *gyrA* や *parC* に変異がなく、かつ EPI の添加により MIC 値が 1/8 以下に低下した菌株が 5 株存在した。これらの株においては薬剤排出ポンプの機能亢進が主な薬剤耐性機構であると考えられた。

表 1. *gyrA*, *parC*, *mexZ*, *mexR*, *nfxB*の変異とシプロフロキサシンおよびパズフロキサシンの MIC の相関

Group, subunit	No. of isolates	Antimicrobial agents	No. of isolates for which MICs (µg/ml) were:											
			<0.12	0.12	0.24	0.49	0.98	1.95	3.91	7.81	15.6	31.25	62.5	>62.5
I, no alteration	52	Ciprofloxacin	1	9	4	4	10	13	9	2				
		Pazufloxacin				13	5	26	6	2				
II, MexZ	1	Ciprofloxacin					1							
		Pazufloxacin						1						
III, MexZ and MexR	7	Ciprofloxacin				4	3							
		Pazufloxacin				1	2	3	1					
IV, GyrA (position 87)	6	Ciprofloxacin					1	3	2					
		Pazufloxacin							1	5				
V, GyrA (position 83)	15	Ciprofloxacin							1	14				
		Pazufloxacin								4	10	1		
VI, GyrA (83) and MexR	13	Ciprofloxacin								3	8	2		
		Pazufloxacin									2	3	8	
VII, GyrA (83) and MexZ	14	Ciprofloxacin						1		9	4			
		Pazufloxacin								2	10	2		
VIII, GyrA (83), MexZ and MexR	2	Ciprofloxacin								1	1			
		Pazufloxacin									1		1	
IX, GyrA (83), ParC and MexR	7	Ciprofloxacin								1	4	2		
		Pazufloxacin								3	2	2		
X, GyrA (83), ParC and MexZ	1	Ciprofloxacin											1	
		Pazufloxacin											1	
XI, GyrA (83 and 87), ParC, MexR and NfxB	1	Ciprofloxacin												1
		Pazufloxacin										1		
XII, GyrA (83 and 87), ParC, MexZ, MexR and NfxB	1	Ciprofloxacin												1
		Pazufloxacin											1	

3. 緑膿菌臨床分離株の薬剤耐性の進化

同一患者由来の緑膿菌臨床分離株を経時的に観察したもののうち、細菌検査室への検体提出日が早い菌株を中心に変異頻度を調べたところ、17株中4株が **Hypermutable** な菌株である可能性が高いという結果が得られた。このような **Hypermutable** な菌株に対して様々な抗菌薬を不十分な標的組織内濃度で長期投与することにより薬剤耐性菌が選択され、抗菌療法をより困難なものにすると考えられる。

同一患者由来の緑膿菌臨床分離株の経時的データおよび ERIC PCR による確認では、最初に検出された菌株の受付日の6か月前に CPFY の投与歴があり、この菌株はすでに CPFY 高度耐性株となっていた。ERIC PCR の泳動パターンおよび MIC 値、変異の有無などを総合的に評価すると、No. 12・34・36、No.19・20、No.35・41、No. 53・54 はそれぞれ同じ由来の菌株であると考えられる。

CPFY の投与が長期に及ばなくとも *gyrA* に変異が起き CPFY 耐性となったことが示唆された。しかも一度 *GyrA* に変異が起きると、たとえキノロンの投与を避けたとしても、感受性株に戻ることは期待できず、感染対策上大きな問題となることが示された。

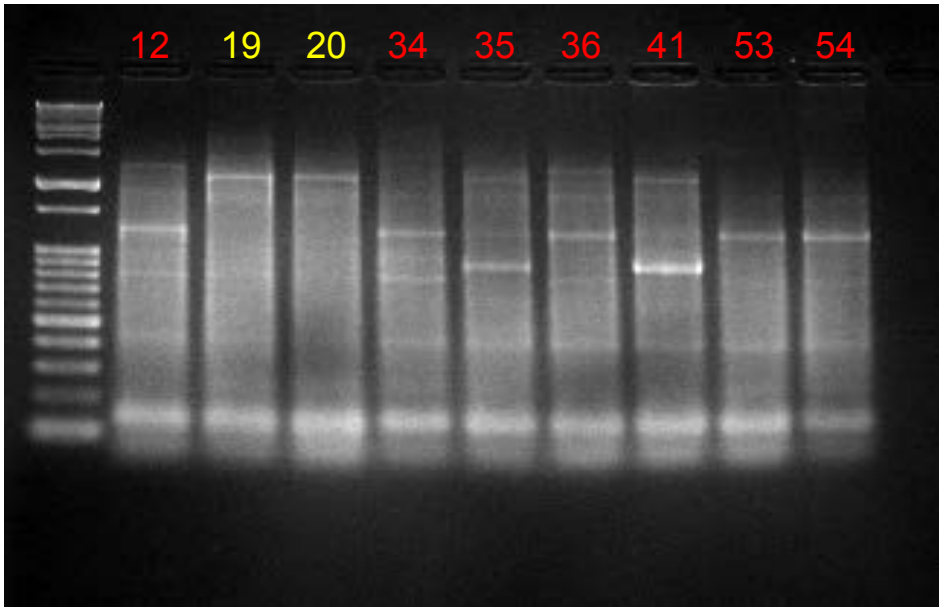


図1 同一患者由来の緑膿菌の ERIC PCR

【結語】

同一患者から、異なる時期に分離された緑膿菌臨床分離株に対する各種抗菌薬の MIC 値の変化と、薬剤耐性に関わる遺伝子の変異の有無から、フルオロキノロン系抗菌薬に対する薬剤耐性機構に、いくつかの新たな知見を得ることができた。

MIC 値と変異の相関については、GyrA や ParC の変異に加えて薬剤排出ポンプ調節遺伝子に変異が存在することで、高度のキノロン耐性を獲得していることが確認できた。特に、GyrA の 83 番目のアミノ酸変異がキノロン耐性に関与する主たる変異であると考えられる。

ERIC PCR による菌株の鑑別を医療現場で応用することにより、院内感染対策における早期発見、早期介入が可能になると考えられる。

低度キノロン耐性の場合には、更なる変異の追加によって高度耐性となり得るので、フルオロキノロン系抗菌薬の使用を避けるべきである。

【対象文献】

Kobayashi H, Isozaki M, Fukuda T, Anzai Y, Kato F.

Surveillance of Fluoroquinolone-Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

OJMM. Vol.3 No.2, 143-150 (2013.)

小林 秀樹氏の学位申請論文「緑膿菌臨床分離株におけるフルオロキノロン耐性に関する研究」に対する審査意見

緑膿菌は環境中に広く分布する弱毒性の細菌であるが、現在、医療施設内での院内感染の原因菌としてメチシリン耐性黄色ブドウ球菌と共に大きな問題となっている細菌である。緑膿菌は他の細菌に比較して、種々の薬剤に対して抵抗性を示すが、様々な薬剤が用いられる医療施設内では更に新たな耐性を獲得し、従来緑膿菌感染症治療に用いられてきたニューキノロン、アミノグリコシド、カルバペネム系の3剤に耐性を獲得した多剤耐性緑膿菌が出現し、ますます治療が困難となっている。

本論文では、東邦大学医療センター大橋病院で、外来患者、入院患者より分離された緑膿菌 373 株について耐性株の分布、シプロフロキサシンに対する耐性機構、シプロフロキサシン高度耐性と変異の蓄積の関連について検討している。

臨床分離株の各種抗菌薬に対する MIC 値の比較から、外来患者由来株と入院患者由来株では、各種抗菌薬の MIC 値は入院患者由来株の方が有意に高いことを明らかにした。外来患者由来株では、ほぼ全ての株がフルオロキノロン感受性株であったが、入院患者由来株では 20%以上が耐性株であること、アミカシン (AMK) とメロペネム (MEPM) でも、外来患者由来株は 100%感受性であったが、入院患者由来の菌株では 5.6%が AMK 耐性で、30.2%が MEPM 耐性である事を示し、医療施設内で分離される緑膿菌にはニューキノロン、アミノグリコシド、カルバペネム系薬剤に対する耐性株が高頻度で存在することを示し、院内での緑膿菌感染症治療の困難さを裏付けること結果を示した。また、シプロフロキサシン耐性を示した分離株について、標的タンパク質である II 型トポイソメラーゼの変異について明らかにするため *gyrA*, *parC* の塩基配列を、薬剤排出ポンプの調節遺伝子の変異による薬剤排出ポンプの発現亢進の可能性を検討するため 3 種の薬剤排出ポンプの調節遺伝子の塩基配列を決定し、変異の有無と耐性の関連を明らかにした。

次いで、フルオロキノロン系抗菌薬の標的分子である II 型トポイソメラーゼを構成する *GyrA*, *ParC* の変異とフルオロキノロン系抗菌薬に対する耐性に相関が見られること、また、緑膿菌のトポイソメラーゼ II の変異によるフルオロキノロン耐性は、まず *GyrA* に変異が起こること、さらに *GyrA* に加えて *ParC* の変異が加わることにより高度耐性になることを示した。更に、*GyrA*, *ParC* のいずれにも変異がないにもかかわらず MIC 値が 15.6 μ g/mL 以上を示す高度耐性株の存在を明らかにした。

これらの耐性株について緑膿菌の 3 種の薬剤排出ポンプそれぞれの発現の制御に関わる遺伝子として、*mexR*, *mexZ*, *nfxB* の変異の有無を調べ、これら調節遺伝子の変異による薬剤排出ポンプの機能亢進によるキノロン耐性を示唆する結果を得た。更に確認するために、efflux pump inhibitor (EPI) を用いた検討を行い、調べた 66 株中 12 株で MIC が 1/8 以下に低下することを示し、薬剤排出ポンプの機能亢進が CPFX 耐性に関与することを明らかにした。

同一患者から複数回分離された緑膿菌株の薬剤耐性化に hypermutability の関与を推定し、8 名の患者から複数回分離された緑膿菌株のうち、初期に分離された菌株を中心に変異頻度を測定し、17 株中 4 株が hypermutable strain であるという結果を得た。更に、ERIC PCR により、同一患者由来の緑膿菌株について菌株間の類似性について検討を行い、抗菌薬の投与によって耐性に関わる変異を起こした菌株が選択されてきたと考えられる結果を得た。

以上、本論文では、院内感染原因菌として重要な緑膿菌、373 株についてシプロフロキサシン耐性を中心に検討を行い、緑膿菌感染症治療薬として用いられてきたシプロフロキサシン耐性株が入院患者由来株では有意

に高くなっていることを明らかにすると共に、その耐性機構について検討を行い II 型トポイソメラーゼの変異、薬剤排出ポンプの機能亢進がシプロフロキサシン耐性に関与していることを明らかにした。更に同一患者由来株の高頻度変異性、ERIC PCR 解析により、抗菌薬の投与により高頻度変異性株に生じた変異が選択され、その変異の積み重ねにより多剤耐性緑膿菌へと変化したと推定される結果を得た。

博士（薬学）に相当する論文と考える。

平成 26 年 2 月 26 日

加藤 文男