

学 位 論 文 題 名

グラム陽性球菌における新キノロン剤の耐性機構に関する研究

学位論文内容の要旨

キノロン系抗菌剤が感染症に有用な抗菌剤として認められる端緒となったのは1962年に合成されたナリジキシ酸の発見である。これを契機として1978年にキノリン骨格の6位にフッ素原子、7位にピペラジニル基を導入したノルフロキサシンが開発されて以来、新キノロン剤が次々と開発され、多くの化合物が実際に臨床に使用されるようになった。新キノロン剤は、ナリジキシ酸等のいわゆるオールドキノロン剤と比べ、グラム陽性菌まで拡大された抗菌スペクトルと強い抗菌力を有している。新キノロン剤では、染色体外遺伝子による耐性の水平伝達は報告されておらず、臨床における耐性の蔓延は起こらないとされてきた。しかし、近年の新キノロン剤の使用量の増大に伴い、グラム陰性菌では *Pseudomonas aeruginosa*、グラム陽性菌では *Staphylococcus aureus* を代表とする菌種で耐性菌が急速に増加し、临床上大きな問題となっている。新キノロン剤耐性機構は、これまで主として *Escherichia coli* および *P. aeruginosa* で解析がなされており、本系統薬剤の標的酵素である DNA ジャイレースの耐性変異および菌對外膜タンパク質の変化に起因すると考えられる薬剤透過性の低下によることが明らかにされている。

本研究では、この様な背景の中で、

その临床上の重要性にも拘らず *Escherichia coli* 等のグラム陰性菌と比較して新キノロン剤耐性機構の研究が殆ど行われていなかったグラム陽性球菌の *Enterococcus faecalis* および *S. aureus* に対する新キノロン剤の作用および耐性機構の解明を目的として、臨床から分離した両菌種のキノロン剤耐性株の DNA ジャイレースの性質を調べると共に、薬剤の取り込みの関与について検討した。

本研究によって、実際に臨床から分離した *E. faecalis* および *S. aureus* の新キノロン剤高度耐性が、主として DNA のスーパーコイリング活性を担う DNA ジャイレースのサブユニット A の変異に原因することを明らかにすると共に、その耐性レベルに薬剤の汲み出し機構 (active efflux) の変化が大きく寄与する可能性を明らかにした。

本研究の結果を要約すると、

1. 腸球菌である *E. faecalis* および *E. faecium* の臨床分離床について年度別に各種抗菌剤への感受性を調べ、両菌種の新キノロン剤への耐性化を明らかにした。
2. *E. faecalis* の新キノロン感受性株 ATCC19433 から分離した DNA ジャイレースのスーパーコイリング活性はオールドキノロン剤であるナリジキシ酸やピペミド酸では阻害されないが、新キノロン剤で強く阻害され、各薬剤の 50% 阻害濃度 (IC_{50}) は最小発育阻止濃度 (MIC) と比較して 10~30 倍高かったが、両者の間に良好な相関が認められた。この結果から、*E. faecalis* においても新キノロン剤の標的酵素は DNA ジャイレースであると考えられ、ナリジキシ酸やピペミド酸に較べ本系統薬剤が優れた抗菌活性を示す原因は DNA ジャイレースに対する強い阻害作用による考えられた。
3. *E. faecalis* の新キノロン剤高度耐性株 MS16968 および中等度耐性株 16996 から分離した DNA ジャイレースのサブユニットと ATCC19433 株のサブユニットから再構成した酵素に対する新キノロン剤の阻害実験から、耐性株の DNA ジャイレースのサブユニット A の耐性変異が明らかとなった。しかし、DNA ジャイレースの阻害実験からは MS16968 株に対する新キノロン剤の MIC が MS16996 株より 2~4 倍高い両耐性株間の耐性レベルの差は説明出来なかった。
4. 上記の耐性株間の耐性レベルの差の原因を明らかにするため、各菌株における新キノロン剤の取り込みについて検討した。その結果、MS16968 株では MS16996 株より取り込み量が $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$ と明らかに少なく、薬剤の取り込み量の差が耐性レベルに関与していることが示唆された。さらに、エネルギー阻害剤である carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) を用いた実験から、*E. faecalis* の新キノロン剤の取り込みに能動的汲み出し (active efflux) と考えられる菌体内の薬剤濃度を減少させる機構が存在することを認め、その機構の変化によると思われる薬剤汲み出しの効率の差異が両耐性株間の耐性レベルの差となって表れることが示唆された。
5. 臨床分離 *S. aureus* 212 株の新キノロン剤への感受性を調べ、本菌種の耐性化を確認した。
6. 次いで、*E. faecalis* での知見をもとに *S. aureus* の新キノロン耐性機構を解明する目的で、臨床分離耐性株における DNA ジャイレースの性質および薬剤の菌体内取り込みの両面から検討を加えた。新キノロン剤感受性の標準株である SA113 株から分離した DNA ジャイレースのスーパーコイリング活性はナリジキシ酸では阻害されないが、新キノロン剤で強く阻害され、各薬剤の IC_{50} は MIC と良好な相関を示した。従って、*S. aureus* においても新キノロン剤の主たる標的は DNA ジャイレースである考えられた。

6. 新キノロン剤に高度耐性を示した臨床分離株 MS16405 の DNA ジャイレースは新キノロン剤に対して耐性を示し、またそのサブユニットと SA113 株のサブユニットとの再構成実験の結果から、本株においても *E. faecalis* の新キノロン剤耐性株の場合と同様に、DNA ジャイレースのサブユニット A の変異が新キノロン剤耐性化の要因であることが明らかとなった。

7. さらに、SA113 と MS16405 両株における新キノロン剤取り込みについて検討した所、MS 16405 の各薬剤の取り込みが SA113 株と比較して著しく低いことを認めた。この両菌株間の取り込みの差は、他の新キノロン剤と比較してシプロフロキサシンやノルフロキサシン等の親水性キノロン剤で顕著であった。さらに、CCCP の新キノロン剤取り込みに対する効果から、本系統薬剤の取り込み過程に active efflux と考えられる親水性キノロン剤の菌体内濃度を減少させる機構が関与している事、およびその機構の変化が *S. aureus* における新キノロン剤への耐性レベルに大きな影響を与えている可能性を明らかにした。以上の実験結果から、MS16405 株の新キノロン剤耐性は、DNA ジャイレースのサブユニット A と薬剤取り込み過程の二重の変異によるものと結論した。

以上の結果、グラム陽性球菌である *E. faecalis* および *S. aureus* から DNA ジャイレースをそれぞれ部分精製し、それらの酵素が *E. coli* や *Bacillus subtilis* などの酵素と類似した生化学的性質を持つことを明らかにした。また、新キノロン剤のこれらグラム陽性球菌に対する優れた抗菌力は、グラム陰性菌に対すると同様に標的酵素である DNA ジャイレースに対する強い阻害作用によること、臨床分離株の新キノロン剤耐性は DNA ジャイレースのサブユニット A の耐性変異が主な原因であることを明らかにした。さらに、薬剤取り込み過程を詳細に検討し、薬剤取り込みには active efflux 機構が関与しており、その変異による変化がグラム陽性球菌の新キノロン剤への耐性レベルを増大させている可能性を明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男

副 査 教 授 千 葉 誠 哉

副 査 教 授 飯 塚 敏 彦

本論文は和文82頁，図20，表15，引用文献138，研究史，2章，和文および英文総括からなり，ほかに参考論文12編が付されている。

ノルフロキサシンを始めとする新キノロン剤は，グラム陽性菌まで拡大した抗菌スペクトルと強い抗菌活性を有する合成抗菌剤として臨床で広く用いられている。新キノロン剤では染色体外遺伝子による耐性伝播は報告されておらず，臨床における耐性の蔓延は起こらないとされてきた。しかし，新キノロン剤の使用量の増加に伴い，临床上重要な菌種で耐性菌が急速に増加し，憂慮すべき問題となっているのが現状である。新キノロン剤耐性株機構は，これまで主として *Escherichia coli* で解析がなされており，DNA ジャイレースの耐性変異および菌対外膜蛋白質の変化による薬剤透過性の低下に起因することが証明されている。一方，グラム陽性菌の耐性機構は，臨床における耐性菌の明らかな増加にも拘らずこれまで殆ど明らかにされておらず，耐性菌に有効な薬剤の探索および治療法の改善のために，その詳細な研究が望まれていた。

本研究では，临床上重要なグラム陽性球菌である *Enterococcus faecalis* および *Staphylococcus aureus* に対する新キノロン剤の耐性機構の解明を目的として，耐性株の DNA ジャイレースの酵素的性質を調べると共に，薬剤の菌体内取り込みについて検討し，両菌種における新キノロン剤耐性機構を明らかにしたものである。

第二編，研究史では，新キノロン剤の作用機作，菌体内透過機構および耐性機構に関する研究史について述べられている。

第三編実験の部，第一章は，*E. faecalis* の新キノロン剤耐性機構について述べられ，下記の内容が含まれている。

1. 腸球菌である *E. faecalis* と *E. faecium* の臨床分離株について，分離年度別に各種抗菌剤への感受性を調べ，両菌種の新キノロン剤に対する耐性化を明らかにした。
2. *E. faecalis* の新キノロン剤感受性株 ATCC19433 から分離した DNA ジャイレースのスーパーコイリング活性は新キノロン剤で強く阻害され，各薬剤の50%阻害濃度 (IC_{50}) と最小阻止濃度 (MIC) 間に良好な相関を認め，本菌種においても新キノロン剤の標的酵素は

DNA ジャイレースであることを明らかにした。

3. *E. faecalis* の新キノロン高度耐性株 MS16968および中等度耐性株 MS16996からそれぞれ分離した DNA ジャイレースのサブユニットと ATCC19433サブユニット間の再構成実験を行い、DNA ジャイレースのサブユニット A の耐性変異が両耐性株の新キノロン剤耐性の原因であることを明らかにした。

4. 耐性株間の耐性レベルの差の原因を明らかにするため、両耐性株における新キノロン剤の取り込みを測定した。また、エネルギー阻害剤の carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazide (CCCP) を用いた薬剤取り込み実験から、*E. faecalis* の新キノロン剤の取り込みに能動的汲み出し (active efflux) が存在し、その変化による薬剤取り込み量の差が耐性レベルの差に関与していることを示唆した。

第二章では、*S. aureus* の新キノロン剤耐性機構について述べられ、下記の内容が含まれている。

1. 臨床から分離された *S. aureus* 212 株の新キノロン剤に対する感受性を測定し、本菌種の耐性化を確認した。
2. 新キノロン剤感受性株 SA113 から DNA ジャイレースを分離し、そのスーパーコイリング活性に対する新キノロン剤の IC₅₀ が MIC と良好な相関を示すことを見だし、*S. aureus* における本系統薬剤の標的も DNA ジャイレースであることを明らかにした。
3. 新キノロン剤に高度耐性を示した臨床分離株 MS16405 から分離した DNA ジャイレースのサブユニットと SA113 のサブユニットとの再構成実験から、本株においても DNA ジャイレースのサブユニット A の変異が新キノロン剤耐性の主因であることを明らかにした。
4. SA113 および MS16405 両株の新キノロン剤取り込みを測定し、MS16405 株の薬剤取り込みが SA113 株と較べ著しく低いこと、また、この取り込みの差は親水性キノロン剤に顕著であることを認めた。さらに、CCCP の取り込みに及ぼす効果から、active efflux と考えられる親水性キノロン剤の菌体内濃度を減少させる機構が関与しており、その変化が *S. aureus* における新キノロン剤への耐性レベルに寄与している可能性を明らかにした。

以上のように、*E. faecalis* および *S. aureus* の新キノロン剤の作用および耐性機構を DNA ジャイレースおよび薬剤取り込みの両面から解析を行い、グラム陽性球菌における新キノロン剤耐性機構の解明に関して基礎的な貢献を果たした。

よって、審査員一同は別に行った学力確認試験の結果と併せて、本論文の提出者中西憲之は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。