

東北医科薬科大学
審査学位論文（博士）

氏名（本籍）	ハヤカ サコ 早川 幸子（福島県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博薬学第 10 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 8 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条 1 項該当
学位論文題名	多剤耐性グラム陰性桿菌に対する抗菌化学療法と耐性獲得制御に関する研究
論文審査委員	主査 教授 柴田 信之
	副査 教授 久下 周佐
	副査 教授 藤村 茂

多剤耐性グラム陰性桿菌に対する抗菌化学療法
と耐性獲得制御に関する研究

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 臨床感染症学教室

薬学専攻博士課程

早川 幸子

目 次

略 語	1
序 論	3
本 論	7

第1章 各種病原微生物に対する tigecycline の抗菌力

第1節 序 論	7
---------	---

第2節 実験材料および方法	9
---------------	---

1. 使用抗菌薬と菌株
2. 薬剤感受性測定
3. ESBL 産生確認試験
4. *in vitro* 抗菌薬負荷による vancomycin 低感受性株の選択

第3節 結 果	11
---------	----

1. 各種病原微生物に対する tigecycline の薬剤感受性
2. vancomycin 低感受性株に対する tigecycline の薬剤感受性

第4節 考 察	14
---------	----

第2章 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (標準株) に対する活性酸素種
(reactive oxygen species: ROS) を用いた多剤耐性獲得効果と抗ROS薬の
耐性獲得制御

第1節 序 論 17

第2節 実験材料および方法 20

1. 使用抗菌薬と菌株
2. 薬剤感受性測定
3. ROS (H₂O₂) の濃度および接種菌量の選択
4. H₂O₂ および各種抗緑膿菌薬負荷による *in vitro* 耐性誘導試験
5. 抗ROS薬の多剤耐性抑制効果の比較
6. DNA シークエンス法によるキノロン耐性決定領域 (QRDR) の
遺伝子解析
7. real time PCR 法によるβ-ラクタム系薬耐性遺伝子の mRNA 発現解析

第3節 結 果 25

1. ROS (H₂O₂) の濃度および接種菌量の選択
2. 各種抗緑膿菌薬負荷による MIC 変化
3. ROS (H₂O₂) および各種抗緑膿菌薬負荷による MIC 変化
(多剤耐性獲得)
4. 抗ROS薬の多剤耐性抑制効果の比較
5. *in vitro* 耐性誘導試験における抗ROS薬の多剤耐性化抑制効果

- 6. DNA シークエンス法によるキノロン耐性決定領域 (QRDR) の
遺伝子解析
- 7. real time PCR 法によるβ-ラクタム系薬耐性遺伝子の mRNA 発現解析

第4節 考 察 33

第3章 *Pseudomonas aeruginosa* 臨床分離株に対する多剤耐性獲得機序の解明と
DHL-His-Zn の可能性

第1節 序 論 37

第2節 実験材料および方法 38

- 1. 対象菌株
- 2. 薬剤感受性測定
- 3. H₂O₂ および piperacillin 負荷による *in vitro* 耐性誘導試験
- 4. PCR-based ORF typing method (POT 法)
- 5. DNA シークエンス法によるキノロン耐性決定領域 (QRDR) の
遺伝子解析
- 6. real time PCR 法を用いた薬剤排出ポンプおよび D2 ポーリンの mRNA
発現解析
- 7. 薬剤排出ポンプ (*mexAB-OprM*) の制御遺伝子 (*mexR*) の
DNA シークエンス解析
- 8. *In vitro* 薬剤排出ポンプ阻害剤による MIC 評価

第3節 結果	42
1. 薬剤感受性試験	
2. H ₂ O ₂ および piperacillin 負荷による多剤耐性獲得と抗 ROS 薬の抑制効果	
3. PCR-based ORF typing method (POT 法)	
4. DNA シークエンス法によるキノロン耐性決定領域 (QRDR) の遺伝子解析	
5. real time PCR 法を用いた薬剤排出ポンプおよび D2 ポーリンの mRNA 発現解析	
6. 薬剤排出ポンプ (<i>mexAB-OprM</i>) の制御遺伝子 (<i>mexR</i>) の DNA シークエンス解析	
7. <i>In vitro</i> 薬剤排出ポンプ阻害剤による MIC 評価	
第4節 考察	48
総括	52
謝辞	56
引用文献	57
論文目録	75

略 語

以下の略語を本文および図表中において使用した。

<i>A. baumannii</i>	: <i>Acinetobacter baumannii</i>
AMK	: amikacin
AMR	: antimicrobial resistance
ASA	: ascoric acid
CAV	: clavulanic acid
CAZ	: ceftazidime
CCCP	: carbonyl cyanide <i>m</i> -chlorophenyl hydrazone
CF	: cystic fibrosis
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CRE	: carbapenem resrstant <i>Enterobacteriaceae</i>
DHL-His-Zn	: sodium zinc histidine dithiooctanamide
DR-PAO1	: drug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> reference strain PAO1
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
ECDC	: European Center for Disease Prevention and Control
EPI	: efflux pump inhibitor
ESBL	: extended-spectrum β -lactamase
EUCAST	: European committee on antimicrobial susceptibility testing
FDA	: Food and Drug Administration
GSH	: glutathione
JANIS	: Japan nosocomial infections surveillance
<i>K. oxytoca</i>	: <i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>K. pneumoniae</i>	: <i>Klebsiella pneumoniae</i>
LVFX	: levofloxacin

MBL	: metallo- β -lactamase
MDR	: multidrug resistance
MDRAB	: multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i>
MDRP	: multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MEPM	: meropenem
MHA	: Mueller-Hinton agar
MIC	: minimum inhibitory concentration
MRSA	: methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>P. aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. mirabilis</i>	: <i>Proteus mirabilis</i>
PA β N	: phenylalanine-arginine- β -naphthylamide
PDR	: pandrug-resistance
PIPC	: piperacillin
POT	: PCR-based ORF typing
QRDR	: quinolone resistance-determining region
ROS	: reactive oxygen species
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
TAZ/PIPC	: tazobactam/piperacillin
TDM	: therapeutic drug monitoring
WT	: wild type
XDR	: extensively drug-resistance

序 論

1928年にアレキサンダー・フレミングにより penicillin が発見されたのち様々な抗菌薬開発が進み、感染症の治療成績は著しく向上し、結核関連死、手術関連死、出産関連死亡者数は激減した^{1,2)}。細菌感染症は致命的な疾患ではないという認識が広まり、1980年代以降、新たな抗微生物薬の開発は減少傾向にあった。しかしながら、同時期より各種薬剤耐性菌が出現し、医療技術の進歩に伴う手術や医療機器に関連した医療関連感染症が増加した²⁾。近年、これら薬剤耐性菌により再び感染症の治療成績は低下し、手術、癌化学療法、移植を含む高度医療の安全な施行が危惧されつつある^{1,2)}。

1961年に英国で methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) による院内感染が報告されたが、本邦では1977年より MRSA による感染症が確認され³⁾、*S. aureus* に占める MRSA の割合は、1984年の6.2%から、僅か3年後に58.2%に増加した^{2,4)}。また、2012年に収集された呼吸器系検体においても、MRSA の割合は51.3%であった⁵⁾。近年、感染対策の強化⁴⁾が図られ、2017年の厚生労働省院内感染対策サーベイランス (JANIS) の成績では、その割合は47.7%とやや減少傾向にある。JANIS 検査部門には参加医療機関より細菌検査を実施した全検体のデータが集積されるが、この総検体中の MRSA の分離率は6.48%であり、フルオロキノロン耐性大腸菌の4.31%を超えて最多となっている。また MRSA

感染症の発症者数は、薬剤耐性菌による新規感染症患者の 93.88% を占めた⁶⁾。

このほか最近では、薬剤耐性グラム陰性桿菌のひとつである extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 産生菌の分離率が世界的に急増している。European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) による欧州 30 か国の「surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2017」では、第 3 世代セファロスポリン系薬の耐性率は *Escherichia coli* が 14.9%、*Klebsiella pneumoniae* は 31.2% であった⁷⁾。JANIS の成績においても、同耐性率は *E. coli* が 7.73% (2010 年) から 17.39% (2017 年) に、*K. pneumoniae* では 3.41% (2010 年) から 6.11% (2017 年) へと増加傾向にある^{5,8)}。また、手術部位感染患者由来の分離菌について 2010 年と 2014-2015 年で比較した報告によると、ESBL 産生株の割合はそれぞれ *E. coli* が 9.5% から 23.0%、*K. pneumoniae* は 0% から 10.7% と増加していた⁹⁾。

さらに、医療関連感染の代表的な原因菌の 1 つである *Pseudomonas aeruginosa* が、欧州では tazobactam/piperacillin、ciprofloxacin、ceftazidime、cefepime、aztreonam、tobramycin、imipenem、meropenem などに多剤耐性を示す extensively drug-resistant (XDR) *P. aeruginosa* や、前述の薬剤にコリスチンなどを含めた 8 系統の抗緑膿菌薬全てに耐性を獲得した pandrug-resistant (PDR) *P. aeruginosa* として出現してきており臨床上問題になっている^{10, 11)}。日本ではフルオロキノロン系薬、アミノグリコシド系薬、カルバペネム系薬の 3 系統の薬剤全てに耐性を示す株が

multidrug-resistant *P. aeruginosa* (MDRP) と定義されており、2017年のJANISの成績では *P. aeruginosa* に占める MDRP の割合は 0.76%⁶⁾、ECDC の薬剤耐性菌サーベイランスによると、これら3系統以上に耐性を示す株は 1.0%であった⁷⁾。また薬剤別の耐性率をみると欧州⁷⁾では tazobactam /piperacillin 耐性率が 18.3%、フルオロキノロン耐性率は 20.3%であり、日本における分離頻度⁵⁾ はそれぞれ 8.7%、14.5%であった。

本邦では、XDR 株や PDR 株の報告はなく、MDRP の割合は欧米諸国に比べ低い値を示しているものの、フルオロキノロン耐性率は類似しており、耐性獲得を制御していくことが課題である。

このように世界的な広がりを見せる薬剤耐性菌に対し、何の対策も講じない場合、耐性菌関連感染症による死亡者数が、2050年までに 1000万人/年に増加するとの予測が 2014年に英国の調査機関から公表された。人口減少は労働力の減少につながるため、GDP 総計 2-3.5%/年の減少が見込まれ、世界規模では 60-100兆 USD の損失になると考えられている¹⁾。

薬剤耐性菌は、主に易感染状態にある高齢者に感染症をもたらすが、本邦では 65歳以上の高齢者数は 2025年には 3,657万人となり、全人口の 30.3%を占めると予想されている⁴⁾。そこで 2016年に日本政府より AMR (Antimicrobial resistance: 薬剤耐性) 対策アクションプランが公表され、医療分野のみならず畜

産分野など多方面から取り組む 6 つのバンドルが掲げられた。すなわち、「1.普及啓発・教育」、「2.動向調査・監視」、「3.感染予防・管理」、「4.抗微生物剤の適性使用」、「5.研究開発・創薬」、「6.国際協力」である。

今回、「2.動向調査・監視」の取り組みである薬剤感受性調査として、第 1 章では抗菌活性を示す薬剤が極めて少ない多剤耐性菌に対し、わが国が海外から緊急導入した新規抗菌薬 **tigecycline** を用い、その抗菌力を調査した。

「5.研究開発・創薬」も AMR 対策アクションプランの柱の一つであるが、現在、抗微生物薬の開発は十分に進展していない。新薬の開発と既存薬の改良には、160 億 USD の費用と 10 年以上もの期間が試算されており、新薬の研究開発もさることながら、用量や適応症の見直しなど、既存薬の有効利用が重要であると報告されている¹²⁾。したがって、第 2、3 章においては、**tigecycline** の適応外菌種であり、院内感染の代表的な起因菌である *P. aeruginosa* を用い、多剤耐性の獲得を助長するメカニズムを解明し、その耐性獲得を抑制する薬剤を明らかにした。

本 論

第 1 章 各種病原微生物に対する tigecycline の抗菌力

第 1 節 序 論

グリシルサイクリン系抗菌薬の tigecycline (Fig. 1) は、テトラサイクリン系抗菌薬と基本骨格は同様であるが、化学構造上の特徴として minocycline の 9 位にグリシルアミド基が結合している。本剤の作用機序は、細菌の 30S リボソームサブユニット中 16S rRNA の 34 番目の helix (h34) を構成する 1054 番目の核酸 (C1054) にグリシルアミド基が水素結合することで、aminoacyl-tRNA の A-site への結合を阻害しタンパク合成を抑制するものである。Tetracycline や minocycline は tigecycline と同様に、helix31 (h31) 残基 (G966) および h34 残基 (C1195、U1196) 間に水素結合を形成する。さらに tigecycline は tetracycline や minocycline ではみられない、h34 残基 (C1054) との間にも 2 本の水素結合を形成する¹³⁾。このリボソームにおける結合部位の相違が、テトラサイクリン耐性菌に交差耐性を示しにくい理由と考えられる。さらに、ESBL、metallo- β -lactamase (MBL)、AmpC 型 β -lactamase による薬剤の不活化、および *E. coli*、*S. aureus*、*Enterococcus faecalis* などにおいてはテトラサイクリン排出トランスポーター等

の発現による耐性化の影響も受けないと報告されている¹⁴⁻¹⁶⁾

本剤のわが国での適応症は、深在性皮膚感染症、外傷・熱傷および手術創等の二次感染、腹腔内膿瘍や胆嚢炎であり、適応菌種は、 β -ラクタム系、フルオロキノロン系、アミノグリコシド系のうち2系統以上に耐性を示す *E. coli*、*Citrobacter* spp.、*Klebsiella* spp.、*Enterobacter* spp.、*Acinetobacter* spp. となっている¹⁷⁾。Carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) などの耐性菌が増加しつつある状況を踏まえ、tigecycline は海外から緊急導入された新規抗菌薬であるが、わが国における各種耐性株に対する抗菌力の成績がなかったことから、東北地方で臨床分離された各種多剤耐性菌に対する tigecycline の抗菌力を調査した。

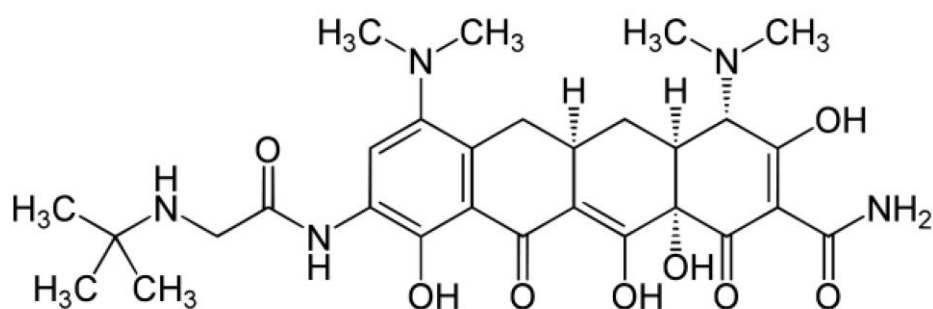


Fig. 1 The structure of tigecycline

第 2 節 実験材料および方法

1. 使用抗菌薬と菌株

Tigecycline 原末は Pfizer (NY) 社より分与されたものを、また vancomycin 原末は Sigma-aldrich (Darmstadt, Germany) より購入したものを使用した。

使用菌株は、2012 年 10 月から 2014 年 10 月に東北地方の 22 医療機関より収集した各種臨床分離株 260 株とした。菌種の内訳は、MRSA: 20 株、*E. coli*: 143 株 (ESBL 産生株 47 株を含む)、*A. baumannii*: 49 株、ESBL 産生の *Proteus mirabilis*: 13 株、同 *K. pneumoniae*: 4 株、同 *K. oxytoca*: 1 株のほか *P. aeruginosa* : 30 株 (多剤耐性株 20 株含む) である。*A. baumannii* の同定は、グラム染色、Triple Sugar Iron (TSI) 寒天培地による非発酵菌の確認、オキシダーゼテスト陰性によるスクリーニング試験の後、BD BBLCRYSTAL E/NF (日本 BD) を用いた。また、MRSA 20 株は、vancomycin の最少発育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration: MIC) =0.5 µg/mL、1 µg/mL を示す株をそれぞれ 10 株ずつ選択した。このうち、臨床分離 MRSA 株 6 株 (TH-1、3、7、11、13、15) と、この 6 株に対し *in vitro* で vancomycin を負荷¹⁸⁾させ、vancomycin の MIC=2 µg/mL を示した 6 株の計 12 株に対する tigecycline の抗菌力も別途調査した。

2. 薬剤感受性測定

Tigecycline の MIC は、フローズンプレートを用いた微量液体希釈法により測定した。Tigecycline の薬剤感受性測定に用いる培地は、酸素による分解を防ぐため作成後 12 時間以内に使用するが、速やかに凍結すればその使用が認められる¹⁹⁾ことから、フローズンプレート (栄研化学) を融解後、速やかに測定に用いた。Tigecycline のブレイクポイント MIC は米国 FDA の基準に準拠し、*Enterobacteriaceae* S: $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ R: $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ 、*S. aureus* S: $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ とした²⁰⁾。また *A. baumannii* については、*Enterobacteriaceae* の基準を参照した。

3. ESBL 産生確認試験

ESBL 産生株の確認は米国 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S23¹⁹⁾に準拠して実施した。すなわち、スクリーニング基準を満たした株に対し、CAZ/Clavulanic acid (CAV) を用いた確認試験を行い、陽性の株を ESBL 産生菌と判定した。

4. *in vitro* 抗菌薬負荷による vancomycin 低感受性株の選択

Vancomycin の MIC が $0.5 \mu\text{g/mL}$ または $1 \mu\text{g/mL}$ を示した MRSA 株 20 株に対し、*in vitro* で vancomycin を負荷¹⁸⁾させた。Vancomycin の $128-0.125 \mu\text{g/mL}$ 含有

ミューラー・ヒントン寒天培地: MHA (栄研化学) の希釈系列を作成し、菌液接種後、37°C 48hr 培養した。sub-MIC に生残した菌株を、別の希釈系列に植え継ぐ操作を 5 回繰り返す、vancomycin の MIC=2 µg/mL の低感受性株を選択した。

第 3 節 結 果

1. 各種病原微生物に対する tigecycline の薬剤感受性

被検菌株に対する tigecycline の薬剤感受性を Table 1 に示す。*E. coli* に対する抗菌力は MIC range: ≤ 0.06 -0.5 µg/mL、MIC₅₀: 0.25 µg/mL、MIC₉₀: 0.25 µg/mL であった。ESBL 産生 *E. coli* では MIC range: ≤ 0.06 -2 µg/mL、MIC₅₀: 0.5 µg/mL、MIC₉₀: 2 µg/mL であり、ESBL 非産生菌に比し、1-3 管高値を示したが、全て tigecycline に感受性を示した。

Tigecycline の抗菌力は、*A. baumannii* に対しては、MIC range: ≤ 0.06 -1 µg/mL、MIC₅₀: 0.12 µg/mL、MIC₉₀: 0.25 µg/mL であり、imipenem および ciprofloxacin の 2 剤耐性株では、MIC range: 0.12-1 µg/mL、MIC₅₀: 0.25 µg/mL、MIC₉₀: 1 µg/mL と全て感受性を示した。Tigecycline は ESBL 産生 *Klebsiella* spp. に対し全て感受性を示したが、ESBL 産生 *P. mirabilis* では MIC range: 1-16 µg/mL、MIC₅₀: 4 µg/mL、MIC₉₀: 8 µg/mL であり 53.8% が耐性株であった。また、MDRP を含む *P.*

aeruginosa に対し、全て耐性を示した。

一方、本邦では適応外であるが、米国および欧州で承認されている MRSA に対する tigecycline の抗菌力は、MIC range: ≤ 0.06 -1 $\mu\text{g/mL}$ 、MIC₅₀: 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、MIC₉₀: 0.5 $\mu\text{g/mL}$ であり、臨床分離株 20 株の 95.0% が tigecycline に感受性を示した。

Table 1 *In Vitro* susceptibility of 260 clinical isolates to tigecycline in the Tohoku area, Japan

Organism (no.)	MIC* range	MIC* ₅₀	MIC* ₈₀	MIC* ₉₀	% S	% I	% R
MRSA (20)	≤ 0.06 -1	0.25	0.25	0.5	95.0	0.0	0.5
<i>E. coli</i> (96)	≤ 0.06 -0.5	0.25	0.25	0.25	100.0	0.0	0.0
<i>A. baumannii</i> (40)	≤ 0.06 -1	0.12	0.25	0.25	100.0	0.0	0.0
DR <i>A. baumannii</i> ** (9)	0.12-1	0.25	0.25	1	100.0	0.0	0.0
ESBL <i>E. coli</i> (47)	≤ 0.06 -2	0.5	2	2	100.0	0.0	0.0
ESBL <i>Klebsiella</i> spp. (5)	0.25-2	1	1	-	100.0	0.0	0.0
ESBL <i>P. mirabilis</i> (13)	1-16	4	8	8	15.4	30.8	53.8
<i>P. aeruginosa</i> (10)	8-64	16	32	64	0.0	0.0	100.0
MDRP (20)	4->64	32	64	64	0.0	0.0	100.0

* MIC = $\mu\text{g/mL}$

** non-susceptible isolates to Imipenem and Ciprofloxacin

2. vancomycin 低感受性株に対する tigecycline の薬剤感受性

vancomycin の負荷により MIC=2 µg/mL を示した MRSA 6 株 (TH-1、3、7、11、13、15) に対する tigecycline の感受性を Table 2 に示す。この 6 株のうち、4 株 (66.7%) は tigecycline 耐性 (MIC=1 µg/mL) を示した。

Table 2 MIC change of tigecycline against *in vitro* selected-MRSA isolates with vancomycin MIC=2µg/mL

MRSA*	MIC (µg/mL)					
	Vancomycin (C → S)**			Tigecycline (C → S)**		
TH-1	0.5	→	2	0.25	→	0.5
TH-3	0.5	→	2	0.5	→	1
TH-7	1	→	2	<0.06	→	0.12
TH-11	1	→	2	0.25	→	1
TH-13	0.5	→	2	0.25	→	1
TH-15	1	→	2	0.12	→	1

* The initial MIC of vancomycin against 6 clinical isolates were ≤1µg/mL.

Each *in vitro* selected isolate was acquired by vancomycin-mutant selection window from clinical isolate, and each MIC was 2µg/mL.

** C : clinical isolates , S : *in vitro* selected isolates

第4節 考察

今回の各種臨床分離株に対する tigecycline 感受性は、欧米で既報告の成績²¹⁻²⁴⁾と同様の傾向がみられた。*P. mirabilis* に対する tigecycline の耐性率²⁵⁾は、米国: 11.6%、欧州: 60.4% と報告されているが、今回の成績では 53.8% であり、欧州の成績とほぼ同等であった。また、tigecycline は *P. aeruginosa* と *P. mirabilis* に対し抗菌力が低い¹⁷⁾とされているが、今回の我々の結果は、これを支持する成績であった。

Tigecycline は院内感染の起因菌として問題となっている MRSA をはじめ、多剤耐性アシネトバクター属菌、carbapenemase または MBL 産生腸内細菌や ESBL 産生菌など多剤耐性グラム陰性桿菌に対しても広域な抗菌活性を示す^{21, 26, 27)}。今回の検討において、多剤耐性アシネトバクター属菌を用いることは出来なかったが、imipenem および ciprofloxacin の 2 剤耐性 *A. baumannii* 9 株は tigecycline に感受性を示した。日本では *A. baumannii* のカルバペネム耐性率は 2.4% と報告されている²⁸⁾が、韓国では 64%²⁹⁾、中国は 67.4%³⁰⁾と高い耐性率が問題になっている。今後、これらの株が国内に持ち込まれる可能性があり、tigecycline は、これらの耐性菌に対する重要な薬剤になるであろう。

近年、世界的には MBL 産生菌や CRE などカルバペネム系抗菌薬を含む β -ラ

クタム系薬に耐性を示す *Enterobacteriaceae* が増加傾向にある³¹⁾。本邦では CRE の分離報告は少ないが、これら CRE に対しても、tigecycline が有用である可能性が考えられた。また本剤は、欧米で適応菌種である MRSA に対しても抗菌活性を示した。本邦では抗 MRSA 薬として、vancomycin、teicoplanin、arbekacin、linezolid、daptomycin、tedizolid の 6 剤が臨床使用されているが、この他に薬剤感受性によっては minocycline が選択されることがある。しかしながら、MRSA に minocycline を投与すると比較的早期に耐性化することが知られている。一方、海外における tigecycline の薬剤感受性サーベイランスの成績では、MRSA に対する感受性率が 100%を保持している³²⁾。将来的には、わが国でも tigecycline が MRSA 感染症の治療薬として検討されるべきであろう。

従来 MRSA 感染症に vancomycin が汎用されるが、TDM により有効血中濃度域を維持する治療を行ったとしても、vancomycin の MIC 値が 2 µg/mL に上昇する症例が散見される。そこで今回、*in vitro* で vancomycin の負荷により選択された vancomycin の MIC=2 µg/mL を示す 6 株に対し、tigecycline の MIC を測定した。今回の検討で、この vancomycin による負荷選択株 6 株は、その 66.7%が tigecycline に耐性を示した。

MRSA における vancomycin の MIC=2 µg/mL を示す機序として、細胞壁の肥厚が影響していると考えられるため、こうした株では tigecycline の菌体内取り

込みが抑制され、耐性を示した可能性が考えられた。これについては、更なる検討が必要である。

今回の結果より、各種臨床分離株および *in vitro* 選択株における tigecycline の抗菌力は、本邦における本剤の適応菌種のみならず、ESBL 産生グラム陰性桿菌や MRSA に対して良好な成績を示した。ただし、*P. aeruginosa*、*P. mirabilis* の感受性率は、0%、15.4%であった。従来 *P. aeruginosa* はテトラサイクリン系薬剤に耐性を示すことが知られており、その機序として薬剤排出ポンプの関連が報告されているが^{33,34)}、tigecycline も tetracycline や minocycline と同様の結果であった¹⁶⁾。したがって、MDRP に用いる抗菌薬は colistin 以外には極めて限定される。こうした現状から *P. aeruginosa* の薬剤耐性を誘導しない適正な抗菌化学療法が求められる。

第2章 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (標準株) に対する活性酸素種

(reactive oxygen species: ROS) を用いた多剤耐性獲得効果と抗 ROS 薬の

耐性獲得制御

第1節 序 論

腸内細菌の一種である *P. aeruginosa* は、病院や高齢者施設などの湿潤環境に長期間定着する医療関連感染の代表的な原因菌である³⁵⁾。免疫抑制状態にあるコンプロマイズドホストは、本菌による敗血症、肺炎、尿路感染などに罹患することがあり、最近では世界中でその薬剤耐性化による治療成績の低下が危惧されている。海外の報告によると、ICUにおけるグラム陰性菌の検出は、入室患者の高い死亡率 (30日後死亡率 35%) と関連があり、その 18%が *P. aeruginosa* であった³⁶⁾。さらに呼吸不全および敗血症患者より分離された緑膿菌に対する抗菌薬の感受性率は低く、tazobactam/piperacillin: 67%、ciprofloxacin: 53%、imipenem: 53%であった³⁶⁾。2000年以降、米国ではESBL産生グラム陰性桿菌、CRE、MDRP、multi drug resistant *A. baumannii* (MDRAB) などの多剤耐性菌が原因となる難治性の腹腔内感染、尿路感染、人工呼吸器関連肺炎および菌血症が報告され、大きな問題になっている。こうした耐性菌の増加が、感染症による

死亡率の上昇や医療費の増加、在院日数および ICU 入室期間の延長などに関連することから、経済的な問題としても認識されている³¹⁾。このほか、米国、フランス、ドイツ、イタリア、スペインの 12 施設における *P. aeruginosa* の調査では、肺炎患者の 30.5% が多剤耐性菌に感染しており、その検出が死亡率増加の独立因子の一つとしてあげられている³⁷⁾。

薬剤耐性菌出現の原因の 1 つに不適切な抗菌薬投与による耐性株の選択が考えられている³⁸⁻⁴⁰⁾。*P. aeruginosa* の耐性機構として、キノロン耐性決定領域 (QRDR) の変異、D2 ポーリンの減少など細菌外膜の変化、薬剤排出ポンプの発現亢進、AmpC 型 β -lactamase など分解酵素の過剰産生、バイオフィーム産生があるが、このほかプラスミド性の MBL 産生遺伝子やアミノグリコシド修飾酵素産生遺伝子の獲得も報告されている⁴⁰⁻⁴²⁾。

他方、*E. coli* では抗菌薬暴露以外に活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) により遺伝子変異が誘発され薬剤感受性が低下することが明らかになった⁴³⁻⁴⁶⁾。*P. aeruginosa* における薬剤耐性獲得への ROS の影響を検討した報告はほとんどなく、これまでの *in vitro* 薬剤耐性化の検討では、菌と抗菌薬の 2 者間で実施されてきた^{47,48)}。しかし *P. aeruginosa* 感染部位では、菌は MIC 以下の濃度の抗菌薬に暴露される以外に、白血球が産生する ROS にもさらされている。今回我々は、実際の感染部位を想定し、臨床で汎用される抗緑膿菌薬加えて ROS の因子

として hydrogen peroxide (H₂O₂) を曝露させ、*P. aeruginosa* における多剤耐性獲得について検討した。さらに、ROS を阻害する抗酸化物質としてα-リポ酸誘導体である「sodium zinc histidine dithiooctanamide (DHL-His-Zn) 」(Fig. 2)⁴⁹⁻⁵²⁾をはじめとする抗 ROS 薬を用い、薬剤耐性獲得制御についても確認した。

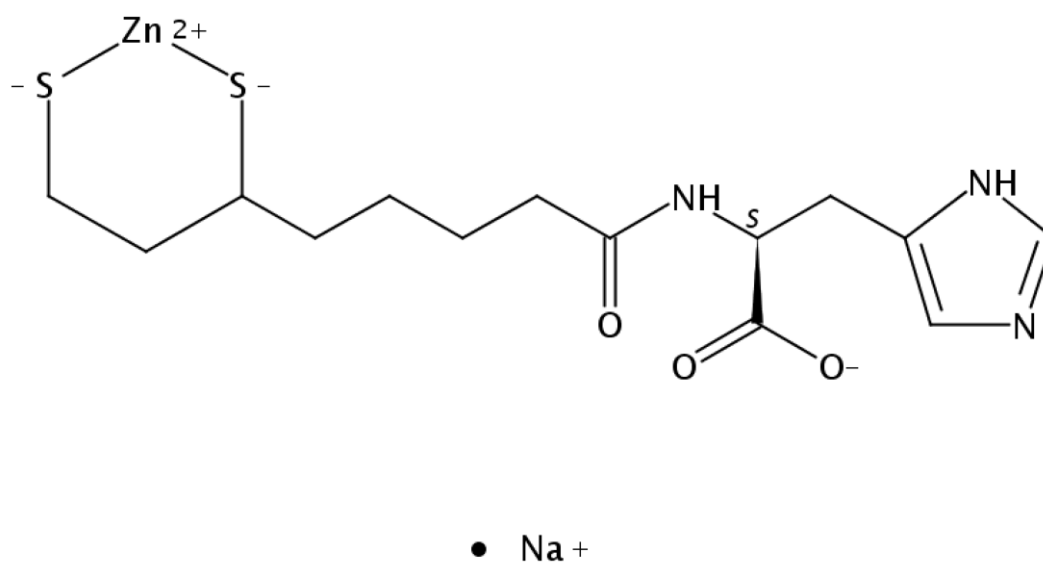


Fig. 2 The structure of sodium zinc histidine dithiooctanamide

第 2 節 実験材料および方法

1. 使用抗菌薬と菌株

各種抗菌薬の原末は、amikacin、levofloxacin、ceftazidime (富士フィルム和光純薬)、meropenem (大日本住友製薬)、piperacillin (大正富山医薬品)、tazobactam (Sigma-aldrich) を使用した。使用菌株は、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (標準株) とした。

2. 薬剤感受性測定

各種抗菌薬の MIC は、MHA を用いた E-test (AB Biodisk, Solana, Sweden) を用いて測定した。被検菌液を、McFarland 比濁法にて生菌数濃度 1.5×10^8 CFU/mL と同等の濁度を示す McFarland no. 0.5 に調整し、MHA へ塗布した後に E-test のストリップを配置し、37 °C で 16-20 時間培養後 MIC を決定した。各薬剤の感受性の判定は、European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) の clinical breakpoint ver. 7.1⁵³⁾ に準拠した。すなわち、piperacillin: >16 µg/mL、ceftazidime: >8 µg/mL、meropenem: >8 µg/mL、levofloxacin: >1 µg/mL、amikacin: >16 µg/mL を耐性と判定した。

3. ROS (H₂O₂) の濃度および接種菌量の選択

今回の検討で ROS として H₂O₂ (富士フィルム和光純薬)を使用した。PAO1 株が H₂O₂ により死滅しない濃度を決定するために 0.1mM、1mM および 10mM の H₂O₂ を含有する MHA を作成し、McFarland no. 0.5、1、2 の菌液 100 μL を接種し、37°C で 24hr 培養後、発育状況を確認した。発育菌数は希釈系列を作成し算出した。

4. H₂O₂ および各種抗緑膿菌薬負荷による *in vitro* 耐性誘導試験

各種抗菌薬 (piperacillin、ceftazidime、meropenem、levofloxacin、amikacin) の sub-MIC を含有した MHA に菌を接種し 37°C 24hr 培養後、生残したコロニーを同濃度の新しい培地に植え継ぐ操作を 5 回繰り返す、MIC の変化を観察した。併せて、各抗菌薬の負荷による他の抗菌薬への交差耐性も確認した。さらに、上記の条件に 1mM H₂O₂ を添加して同様の操作を行い MIC 変化と交差耐性を確認した。対象として H₂O₂ もしくは DHL-His-Zn のみを含有した MHA で同様の検討を行った。

5. 抗 ROS 薬の多剤耐性抑制効果の比較

4.で多剤耐性株が誘導された 1mM H₂O₂ および sub-MIC 抗緑膿菌薬含有 MHA に抗 ROS 薬を添加し、この多剤耐性化が抑制されるかどうか確認した。抗 ROS 薬として α -リポ酸誘導体 (DHL-His-Zn)、また代表的な抗酸化物質である ascorbic acid、glutathione を用い、各々 1mM で耐性獲得抑制効果を比較した。また DHL-His-Zn を 0.1mM、1mM の 2 つの濃度で検討し、至適濃度を決定した。

6. DNA シークエンス法によるキノロン耐性決定領域 (QRDR) の遺伝子解析

各抗菌薬の負荷により levofloxacin の耐性を示した株を用い、キノロン耐性決定領域: QRDR (*gyrA*、*gyrB*、*parC*、*parE*) の遺伝子変異の有無を確認した⁵⁴⁻⁵⁶)。使用したプライマーを Table 3 に示す。DNA は InstaGene™ Matrix (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて抽出した。PCR は総量 25 μ L、2.5 U Takara Ex Taq (タカラバイオ) とし、T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD) を用い、*gyrA*、*parC*、*parE* の反応条件は 94°C 3 分、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分を 1 サイクルとし、計 35 サイクル行った⁵⁴)。一方 *gyrB* については、94°C 2 分後、94°C 1 分、60°C 30 秒、72°C 1 分を 1 サイクルとし 25 サイクル実施した⁵⁵)。2% アガロースゲルを用いた電気泳動法により PCR 増幅産物を確認した後、増幅産物を Fast Gene™ Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス) で精製し、各遺伝子の塩基

配列を ABI3130XL (Applied Biosystems, Foster City CA) を用いた Dye Terminator Cycle Sequencing 法にて決定した。

7. real time PCR 法によるβ-ラクタム系薬耐性遺伝子の mRNA 発現解析

各抗菌薬および 1mM H₂O₂ 負荷により 2 剤耐性 (piperacillin、levofloxacin) 耐性を示した株 (DR-PAO1) について、β-ラクタム系薬の耐性に関与する遺伝子 (*ampC*、*mexA*、*oprD*) の mRNA 発現量を比較した。PAO1 株および DR-PAO1 株の total RNA を AurumTM Total RNA Mini Kit (BIO-RAD) を用いて抽出した。Bio Spec-nano (島津製作所) を用い RNA 濃度を確認し、50 ng の total RNA と iScriptTM One-Step RT-PCR kit with SYBER[®] green (BIO-RAD) および、*ampC*、*mexA*、*oprD* に対する各々のプライマー (Table 3) を用い^{55,57)}、real time PCR (SmartCycler CFX96: BIO- RAD) を行った。なお、本測定は 2 回実施された。

内在性コントロールとして 16S rRNA の合成プライマー (PSD7) を用い補正し⁵⁸⁾、各遺伝子の発現量は検量線を用いて算出した。PAO1 株と比較し、2 倍以上を発現亢進、0.5 以下を発現低下⁵⁷⁾、また *oprD* については 30% の減少を発現抑制と定義した⁵⁹⁾。

Table 3 PCR primers used in this study

primer name	sequence (5'-3')	product size(bp)	Reference
PSD7-F	CAAACTACTGAGCTAGAGTACG	215	[58]
PSD7-R	TAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCT		[58]
<i>gyrA</i> -F	AGTCCTATCTCGACTACGCGAT	378	[54]
<i>gyrA</i> -R	AGTCGACGGTTTCCTTTTCCAG		[54]
<i>gyrB</i> -F	TCTCCTCCGAGGTGAAGACT	781	[55]
<i>gyrB</i> -R	TACAGGCGCGACAGGCGCTT		[56]
<i>parC</i> -F	GCAGCAGGCCTATCTGAACTAT	304	[54]
<i>parC</i> -R	GAAGGACTTGGGATCGTCCGGA		[54]
<i>parE</i> -F	CGGCGTTCGTCTCGGGCGTGGTGAAGGA	592	[54]
<i>parE</i> -R	TCGAGGGCGTAGTAGATGTCCTTGCCGA		[54]
<i>ampC</i> -F	GGTGCAGAAGGACCAGGCACAGAT	97	[57]
<i>ampC</i> -R	CGATGCTCGGGTTGGAATAGAGGC		[57]
<i>mexA</i> -F	GGATCGTGACCTTGAAG	112	[55]
<i>mexA</i> -R	TTGAGGATGATGCCGTTCA		[55]
<i>mexY</i> -F	CCGCTACAACGGCTATCCCT	246	[59]
<i>mexY</i> -R	AGCGGGATCGACCAGCTTTC		[59]
<i>mexC</i> -F	AGCCAGCAGGACTTCGATACC	314	[69]
<i>mexC</i> -R	ACGTCGGCGAACTGCAAC		[69]
<i>oprD</i> -F	CGGCGACATCAGCAACACC	194	[57]
<i>oprD</i> -R	GGGCCGTTGAAGTCGGAGTA		[57]
<i>mexR</i> -F	CTACCCCGTGAATCCCGAC	434	[72]
<i>mexR</i> -R	TATCCTCAAGCGGTTGCGC		[72]

第3節 結果

1. ROS (H_2O_2) の濃度および接種菌量の選択

PAO1 株が H_2O_2 により死滅することなく安定して発育する濃度は、0.1mM もしくは 1mM であった。 H_2O_2 に抗菌薬負荷が重なるため菌の発育抑制を考慮し、これら 2 濃度の H_2O_2 存在下で同等の菌量が発育する、McFarland no. 2 の菌液 100 μL を接種条件とした (Fig. 3)。

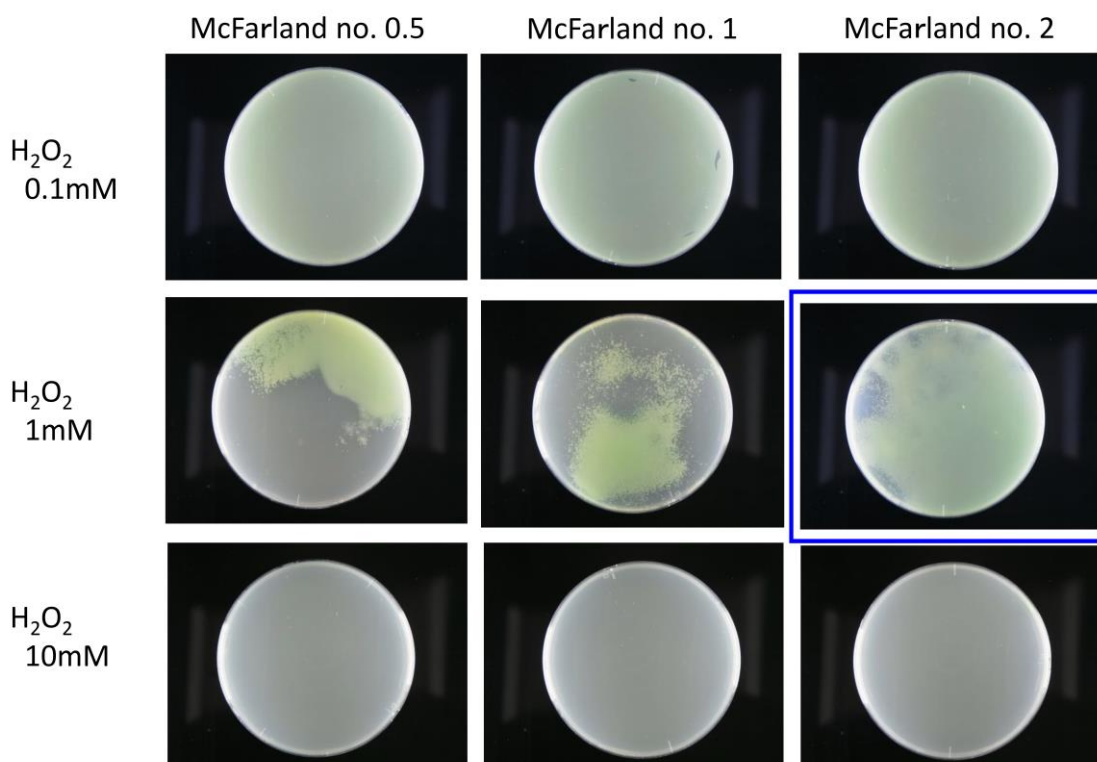


Fig. 3 The selection of ROS-concentration and number of organisms for incubation

2. 各種抗緑膿菌薬負荷による MIC 変化

各種抗緑膿菌薬の MIC 値は、piperacillin: 2 µg/mL、ceftazidime: 0.25 µg/mL、meropenem: 0.25 µg/mL、levofloxacin: 0.25 µg/mL、amikacin: 2 µg/mL であった。各抗緑膿菌薬の負荷による MIC 変化を Fig. 4 に示す。Piperacillin の MIC 値は、ceftazidime および levofloxacin による負荷 5 回目に 2 µg/mL から 16 µg/mL (8 倍) に、meropenem 負荷 5 回目に 8 µg/mL (4 倍) へ上昇した。また、meropenem の MIC 値は levofloxacin による負荷 5 回目に 0.25 µg/mL から 1 µg/mL へ 4 倍上昇し、ceftazidime の MIC 値は piperacillin、levofloxacin、amikacin による負荷 5 回目に 0.25 µg/mL から 1 µg/mL (4 倍) へ上昇した。しかし、それ以外の薬剤では負荷 5 回目に MIC 値が 2 倍上昇もしくは不変であり、大きな変化がみられなかった。

H₂O₂ (1mM) 負荷のみでは PAO1 株の MIC はほとんど変化しなかった (Fig. 5)。また 1mM DHL-His-Zn 負荷時も同様に、各抗菌薬の MIC は不変もしくは 2 倍上昇したのみで、ほとんど変化しなかった (date not shown)。

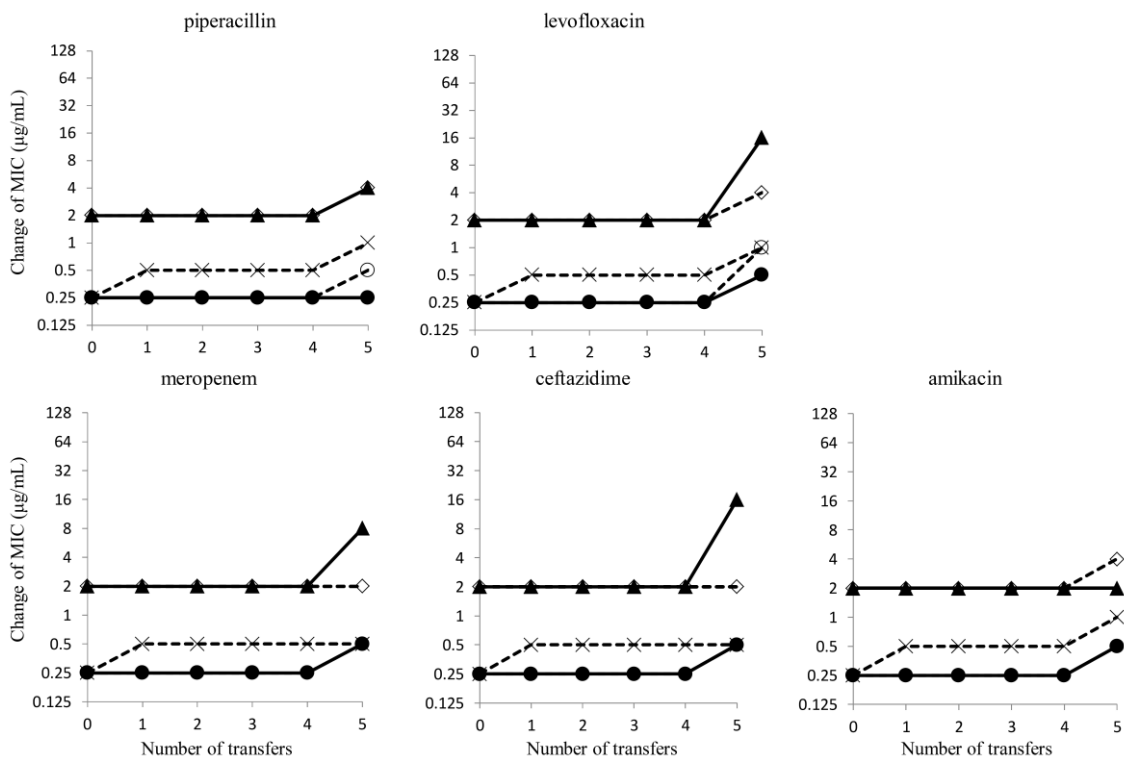


Fig. 4 Change of the MIC after exposure of the reference strain to sub-MIC of each anti-pseudomonas antimicrobial agent

Closed triangles: piperacillin, closed circles: levofloxacin, open circles: meropenem, cross: ceftazidime, open diamonds: amikacin

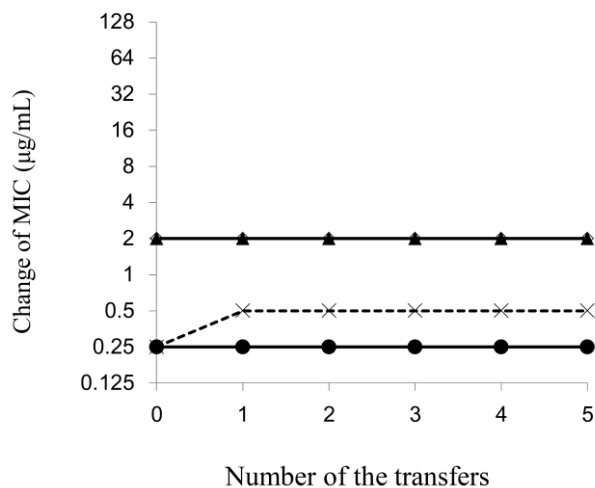


Fig. 5 MIC of antibiotics after exposure of the reference strain to 1mM H₂O₂

Closed triangle: piperacillin, closed circle: levofloxacin, open circle: meropenem, cross: ceftazidime, open diamonds: amikacin

3. ROS (H₂O₂) および各種抗緑膿菌薬負荷による MIC 変化 (多剤耐性獲得)

H₂O₂ (1mM) と sub-MIC の各種抗菌薬暴露による MIC 変化を Fig. 6 に示した。

H₂O₂ および piperacillin の負荷により piperacillin および levofloxacin が耐性を獲得した。すなわち piperacillin の MIC 値は 2 µg/mL から 64 µg/mL へと 32 倍上昇し、さらに levofloxacin の MIC 値が 0.25 µg/mL から 2 µg/mL へ上昇し、ともに耐性を獲得した。他方、levofloxacin 負荷により ceftazidime の MIC が 0.25 µg/mL から 1 µg/mL へ上昇したが、levofloxacin を含め他の薬剤の MIC はほとんど変わらなかった。他の 3 薬剤の負荷においても各薬剤の MIC 値の変動はほとんどなかった。

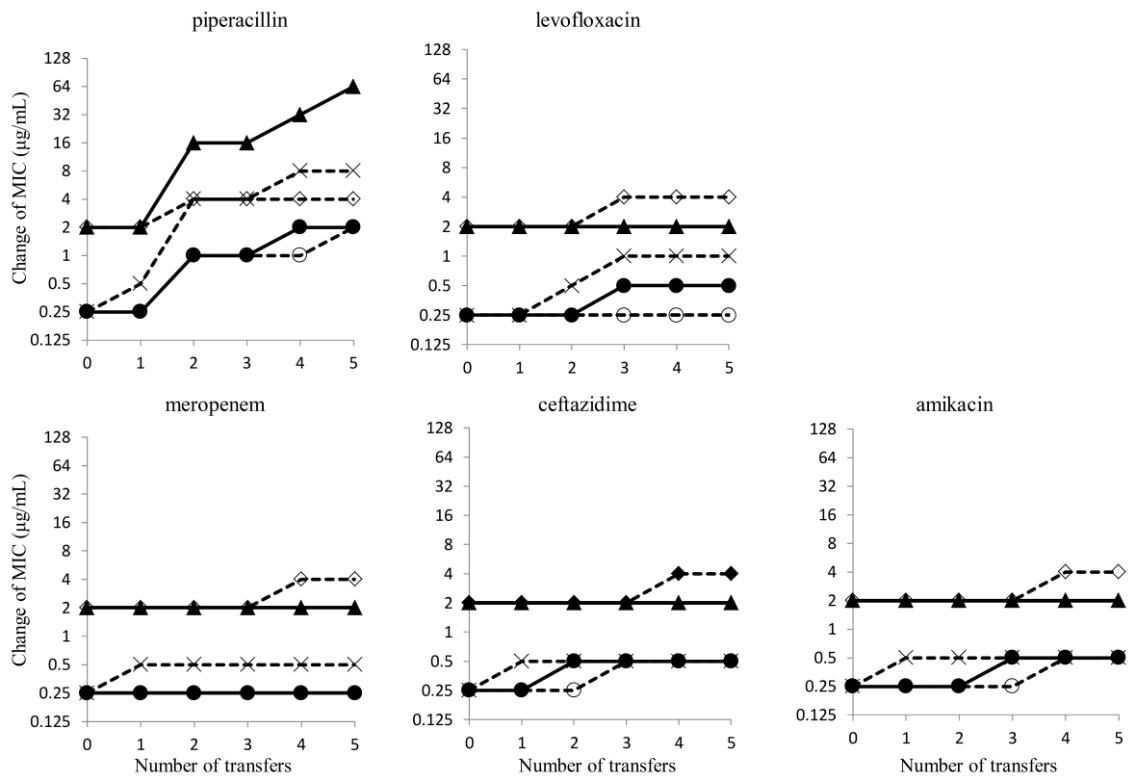


Fig. 6 Change of the MIC after exposure of the reference strain to sub-MIC of each anti-pseudomonas antimicrobial agent plus 1 mM H₂O₂

Closed triangles: piperacillin, closed circles: levofloxacin, open circles: meropenem, cross: ceftazidime, open diamonds: amikacin

4. 抗 ROS 薬の多剤耐性抑制効果の比較

PAO1 株が piperacillin および levofloxacin に耐性を獲得した、1mM H₂O₂ および sub-MIC の piperacillin 含有 MHA に、それぞれ 1mM の DHL-His-Zn、ascorbic acid および glutathione を添加し耐性獲得抑制効果を確認した。各々の抗 ROS 薬添加時の MIC 変化は、piperacillin は 2 µg/mL、32 µg/mL、64 µg/mL であった。

また、levofloxacin の MIC は 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と、DHL-His-Zn が最も MIC 上昇を抑制した (Table 4)。さらに、DHL-His-Zn を 0.1mM、1mM の 2 濃度で同 MHA へ添加したところ、1mM の濃度で PAO1 株の耐性獲得抑制効果が確認された (data not shown)。

Table 4 Inhibitory effect by each anti-ROS agent addition to PAO1 that acquired multi-drug resistance by exposure to piperacillin plus ROS (H_2O_2).

exposed by following agents (5 days)	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	PIPC	LVFX
PAO1	2	0.25
H_2O_2 + PIPC	32	2
H_2O_2 + PIPC + DHL	2	0.5
H_2O_2 + PIPC + ASA	32	1
H_2O_2 + PIPC + GSH	64	1

PIPC: piperacillin, LVFX: levofloxacin, DHL: DHL-His-Zn, ASA: ascorbic acid, GSH: glutathione

Pseudomonas aeruginosa reference strain PAO1 was exposed to 1mM H_2O_2 , sub-MIC of piperacillin and each 1mM anti-ROS agent (DHL-His-Zn, ascorbic acid, glutathione)

Each MIC was determined by E-test method

5. *in vitro* 耐性誘導試験における抗 ROS 薬の多剤耐性化抑制効果

抗 ROS 薬である α -リポ酸誘導体 DHL-His-Zn (1mM) を H_2O_2 および sub-MIC piperacillin 含有 MHA へ添加し、*in vitro* 耐性誘導試験と同様の操作を行ったが、piperacillin の MIC は親株と同様に 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のまま上昇せず、耐性化が抑制された。さらに levofloxacin の MIC 上昇もみられず、交差耐性も抑制された。(Fig. 7)

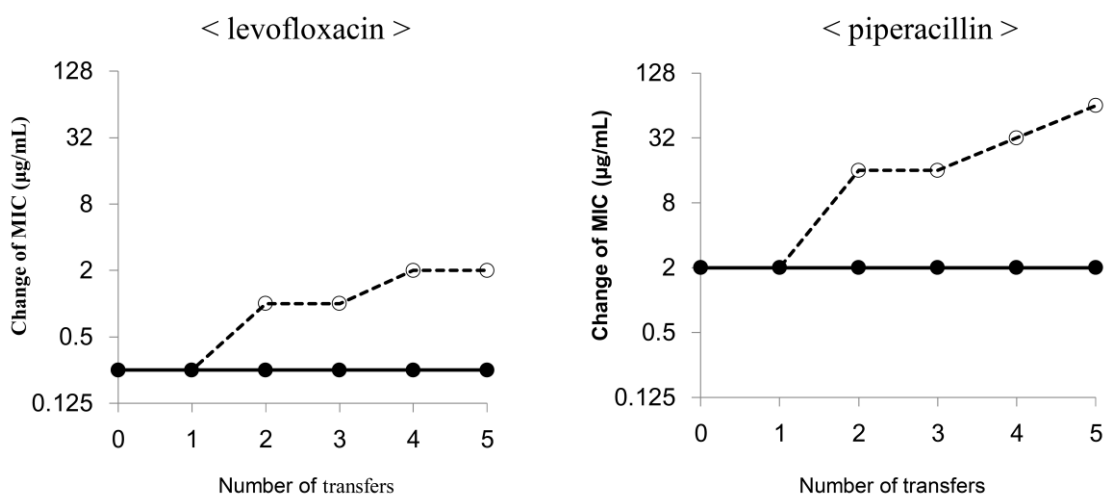


Fig. 7 MIC change after exposure of the reference strain to piperacillin plus ROS, and inhibitory effect of DHL-His-Zn

The MIC of each antibiotic was increased by treatment with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ piperacillin and 1mM H_2O_2 . DHL-His-Zn inhibited the increase of MIC.

Open circles : 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ piperacillin + 1 mM H_2O_2 ,

closed circles : 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ piperacillin + 1 mM H_2O_2 + 1 mM DHL-His-Zn

6. DNA シーケンス法によるキノロン耐性決定領域 (QRDR) の遺伝子解析

sub-MIC の piperacillin および H₂O₂ 負荷により piperacillin および levofloxacin に耐性を獲得した DR-PAO1 株における ParE のアミノ酸配列のうち S373I、A375D、R378H の 3 つの変異が確認された。しかしながら GryA、GryB、ParC には変異はみられなかった。

7. real time PCR 法によるβ-ラクタム系薬耐性遺伝子の mRNA 発現解析

PAO1 株および DR-PAO1 株について、*ampC*、*mexA*、*oprD* 各遺伝子の mRNA 発現量を Fig. 8 に示した。DR-PAO1 株 *oprD* の発現量は 1.00 であり、PAO1 株の 1.50 と比較し、66.7%と発現低下が確認された。

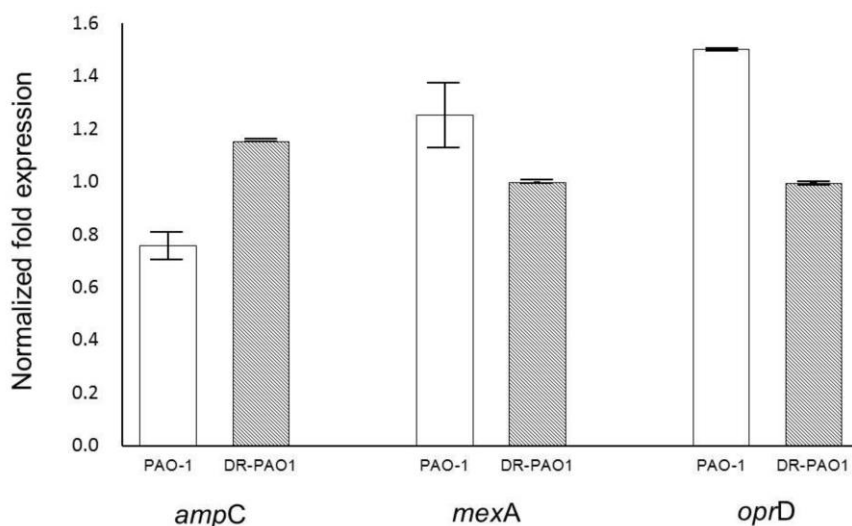


Fig. 8 Comparison of mRNA expression of genes conferring β-lactam and levofloxacin resistance

White column: PAO-1 strain, gray column: drug-resistant (DR) PAO-1 strain induced by 1 μg/mL piperacillin + 1 mM H₂O₂

第4節 考察

生体内における ROS は、ミトコンドリアにおいて ATP 産生の際に副次的に発生するのに加え、侵入異物に対する免疫応答、不要な細胞の処理などの際に白血球より産生される。これらは通常カタラーゼやスーパーオキシドジスムターゼにより速やかに解毒されるが、過剰な ROS は生体内の脂質、タンパク質、酵素を酸化させ、ときに DNA を損傷させる^{44, 60)}。こうした ROS は、感染巣の細菌に対し、高濃度では殺菌的に作用するが、低濃度では遺伝子変異による薬剤耐性を誘発する^{43, 47, 61, 62)}。

P. aeruginosa において 1mM H₂O₂ と amikacin または tobramycin の負荷により、*mexXY* が高発現しアミノグリコシド系薬の感受性が低下するとの報告がある⁶³⁾。

「嚢胞性線維症 (Cystic fibrosis: CF)」は指定難病の 1 つであり、その患者の細気管支には粘稠性の高い粘液が貯留し、緑膿菌などが定着すると、持続感染を伴う慢性的な肺の炎症が生じる。多核白血球から放出される ROS により、guanine が酸化され 8-oxo-2'-deoxyguanosine となり、細菌の遺伝子変異が生じると言われている。Ciohu らは CF 患者の喀痰由来の *P. aeruginosa* は 54.4% が変異修復関連遺伝子に変異のある hyper mutable strain (mutator) であり、それらは野生株と比較し tazobactam/piperacillin、aztreonam、ceftazidime などの抗緑膿菌薬に低感受性

であったと報告している。CF 患者の喀痰を経時的に調査した成績では、mutator は罹患後 5 年でも検出されており、以後、年次ごとに増加していた⁶⁴⁾。これら患者の抗菌薬投与歴に関する記述はみられないが、患者体内の緑膿菌は抗緑膿菌薬と同時に、多核白血球による慢性的炎症の酸化ストレスに長期間さらされたことが、mutator の出現に関連していると推察される。

今回、我々は *P. aeruginosa* PAO1 (標準株) を用い、生体内酸化ストレスを想定し H₂O₂ と sub-MIC 各種抗緑膿菌薬の負荷による交差耐性について検討した。1mM H₂O₂ のみの負荷により PAO1 標準株に対する各抗菌薬 MIC は変化しなかった。しかしながら、H₂O₂ に piperacillin の負荷を加えたところ、piperacillin のみならず levofloxacin の MIC 値も 0.25 µg/mL から 2 µg/mL に上昇し、多剤耐性を示した。この多剤耐性が誘導された標準株 (DR-PAO1) では、D2 ポーリンをコードする *oprD* の発現量が低下していた。さらに、これまで報告の無い QRDR の ParE のアミノ酸変異 (S373I、A375D、R378H) も確認された。このような傾向は、セファロスポリン系やカルバペネム系など他のβ-ラクタム系薬では認められなかった。ペニシリン系薬の暴露に加えて ROS による酸化ストレスが *P. aeruginosa* の DNA に損傷を与え、多剤耐性化を引き起こしたものと考えられた。

グラム陰性菌に様々な系統の抗菌薬を暴露させ、ヒドロキシラジカルの産生について調査⁴³⁾した報告では、ペニシリン系薬の負荷により、*E. coli* の菌体内

においてヒドロキシラジカルの産生がみられている。さらに *E. coli* において、 H_2O_2 、MIC 以下のフルオロキノロン系薬やペニシリン系薬の負荷により遺伝子変異率が上昇することも報告された⁴⁵⁾。今回の実験で使用された 1mM H_2O_2 に加え、この菌体内で産生された ROS が影響し、ParE のアミノ酸変異もしくは *oprD* の発現抑制が生じ、 β -ラクタム系薬のなかで、ペニシリン系薬負荷がフルオロキノロン系薬に交差耐性を示した可能性が考えられた。

今回の基礎的検討から、抗緑膿菌活性を有する piperacillin の低用量による使用は、生体内 ROS 因子として用いた H_2O_2 と相まって levofloxacin の交差耐性を誘発する可能性を示した。さらに、今回の検討で、 H_2O_2 と piperacillin の負荷により、耐性には至らなかったものの meropenem の MIC 値も上昇したことに注意しなければならない。今回確認された *in vitro* 多剤耐性化現象は抗 ROS 薬である α -リポ酸誘導体の DHL-His-Zn の添加により抑制された。本剤は、 α -リポ酸にヒスチジンおよび亜鉛を結合させた抗酸化物質であり、代表的な抗酸化物質である ascorbic acid と glutathione を用い、それぞれ耐性獲得抑制効果を比較したところ、DHL-His-Zn が最も優れた成績を示した。

新たな多剤耐性菌が世界中で増えている現状において DHL-His-Zn の併用による薬剤耐性化の抑制は、難治性感染症の治療成績向上につながる可能性がある

る。抗 ROS 薬は、世界中で問題となっている多剤耐性グラム陰性桿菌の MDR 化を抑制する物質として期待される。

結語として、今回我々は、*P. aeruginosa* に対する従来の抗菌薬暴露による *in vitro* 耐性誘導試験に、生体内要素として ROS による酸化ストレスを加えた検討により、低濃度の piperacillin および ROS の刺激により *P. aeruginosa* が MDR 化することを明らかにした。近年の抗菌薬治療は高用量投与が推奨されているが、世界ではペニシリン系薬を高用量で使用できる国は多くない。深部膿瘍および CF などの感染症では、抗菌薬が感染部位に移行しにくいいため、起因菌が低濃度の抗菌薬に暴露される可能性がある。そのような条件下で細菌に酸化ストレスがかかることで、多剤耐性菌が出現することがあるだろう。*P. aeruginosa* が想定される感染症に対し、抗緑膿菌用ペニシリン系薬を高用量で投与することは非常に重要であり、また、DHL-His-Zn などの抗 ROS 薬の併用が、治療効果の向上ならびに多剤耐性菌の出現抑制に寄与する可能性がある。

第3章 *Pseudomonas aeruginosa* 臨床分離株に対する多剤耐性獲得機序の解明と DHL-His-Zn の可能性

第1節 序論

P. aeruginosa における薬剤耐性株出現の原因の1つとして、抗菌薬の暴露が知られているが、*P. aeruginosa* の薬剤耐性獲得における ROS の影響を検討した報告はほとんどない。*P. aeruginosa* の酸化ストレスによる多剤耐性化の機序としては、MexR (*mexAB-oprM* の制御因子) の遺伝子変異および酸化が知られている。MexR の Cys30 と Cys62 の SH 基が酸化され、S-S 結合が形成されるとそのフォールメーションが変化し、MexR はプロモーターから解離する。すると MexR による抑制が解除され *mexAB-oprM* の翻訳が活性化されることで薬剤排出ポンプの発現が亢進すると報告されている^{65, 66)}。また、cystic fibrosis 患者から分離された *P. aeruginosa* は、白血球から生じるミエロペルオキシダーゼや H₂O₂、HOCl などの酸素ラジカルにさらされており、薬剤耐性株の出現や薬剤耐性に関与する遺伝子の変異が生じやすいとされている^{60, 67)}。

第2章では、臨床で汎用される抗緑膿菌薬と ROS の負荷により、*P. aeruginosa* PAO1 (標準株) が多剤耐性を獲得することを示した⁵⁵⁾。第3章では、臨床分離株においても同様に多剤耐性の獲得がみとめられるか否か、またその発現頻度について調査した。さらに耐性機序の遺伝子学的検討を行い、抗 ROS 薬の添加による耐性出現の抑制効果についても検討した。

第2節 実験材料および方法

1. 対象菌株

東北地方の16施設の総合病院より2012年および2014年に臨床分離された *P. aeruginosa* 413株を対象とした。これらの株のうち、抗緑膿菌活性を有する抗菌薬である piperacillin、 tazobactam/piperacillin、 ceftazidime、 meropenem、 levofloxacin、 amikacin の6剤全てに感受性を示し、ROS すなわち H₂O₂ (富士フィルム和光純薬) 含有培地で発育した20株を選択した (Table 5)。これら20株の検体由来は、喀痰7株 (35%)、尿6株 (30%)、咽頭2株 (10%)、その他 (血液、膿汁、腹水等) 5株 (25%) であった。

2. 薬剤感受性測定

微量液体希釈法にて MIC を測定した。測定には、piperacillin (大正富山医薬品)、tazobactam (Sigma-aldrich)、ceftazidime (富士フィルム和光純薬)、meropenem (大日本住友製薬)、levofloxacin、amikacin (富士フィルム和光純薬) の6剤を使用した。精度管理株として *Escherichia coli* ATCC 25922、*Staphylococcus aureus* ATCC 29213、*P. aeruginosa* ATCC 27853 を用いた。対象菌株の薬剤感受性は、EUCAST clinical breakpoint ver. 7.1 に準拠した⁵³⁾。『第2章 第2節 実験材料および方法 2. 薬剤感受性測定』への記載に加え、tazobactam/piperacillin: > 16 µg/mL を耐性と判定した。

Table 5 Antimicrobial susceptibilities and specimens against 20 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Strain no.	origin	MIC($\mu\text{g/ml}$)					
		PIPC	TAZ/PIPC	CAZ	MEPM	LVFX	AMK
Pa-1	sputam	2	2	1	0.125	0.125	1
Pa-2	pharynx	4	4	2	0.25	0.25	2
Pa-3	discharge of drain	2	2	1	0.125	0.25	1
Pa-4	pharynx	2	2	1	0.25	0.25	2
Pa-5	secretion	0.5	0.25	1	0.016	0.063	0.5
Pa-6	urine	1	1	0.5	0.125	0.25	1
Pa-7	urine	0.25	0.25	0.125	0.016	0.031	0.25
Pa-8	sputam	0.125	0.125	0.25	0.063	0.125	0.5
Pa-9	sputam	2	2	1	0.25	0.125	1
Pa-10	sputam	1	4	2	0.125	0.25	1
Pa-11	urine	1	1	0.5	0.25	0.5	4
Pa-12	urine	2	8	2	1	0.25	1
Pa-13	pus	4	4	4	0.25	0.5	2
Pa-14	sputam	0.5	0.5	2	0.016	0.063	4
Pa-15	sputam	4	8	2	0.25	0.25	2
Pa-16	urine	4	4	2	1	0.5	2
Pa-17	blood	4	4	4	0.5	0.25	2
Pa-18	urine	4	4	2	0.5	0.5	2
Pa-19	ascites	4	8	2	0.125	0.25	0.5
Pa-20	sputam	4	4	2	0.25	0.5	2

PIPC: piperacillin, TAZ/PIPC: tazobactam/piperacillin, CAZ: ceftazidime, MEPM: meropenem, LVFX: levofloxacin, AMK: amikacin

3. H₂O₂ および piperacillin 負荷による *in vitro* 耐性誘導試験

in vitro 耐性誘導試験は『第2章 第2節 実験材料および方法 4. H₂O₂ および各種抗緑膿菌薬負荷による *in vitro* 耐性誘導試験』の方法⁵⁵⁾を一部改変して実施した。すなわち sub-MIC の piperacillin および 1mM H₂O₂ を添加した MHA に、

McFarland no. 2 に調整した菌液を 100 μ L 接種し 37°C 24 時間培養した。さらに、その生残株を piperacillin および H₂O₂ 含有 MHA に接種する操作を 5 回繰り返した。5 回の負荷後に生残した株の piperacillin および levofloxacin の MIC を測定した。また、piperacillin と H₂O₂ の他に抗 ROS 作用を示す DHL-His-Zn を 1mM 添加した培地を使用し、菌液または生残株を 5 回植え次ぐ操作を実施した⁵⁵⁾。

4. PCR-based ORF typing method (POT 法)

Piperacillin および levofloxacin に耐性を獲得した株に対する遺伝子的関連性を、Cica geneus[®] Pseudo POT kit (関東化学) を用いた PCR-based ORF typing method (POT 法)⁶⁸⁾ にて解析した。すなわち、複数のプライマーセットを含む専用試薬によるマルチプレックス PCR を用いて特定遺伝子領域を増幅、および 4% アガロースゲル電気泳動にて遺伝子産物のパターン解析による菌体間の相同性を比較した。

5. DNA シークエンス法によるキノロン耐性決定領域 (QRDR) の遺伝子解析

Piperacillin および levofloxacin に耐性を示した *P. aeruginosa* 株に対し、DNA ジャイレース (*gyrA*、*gyrB*) およびトポイソメラーゼ IV (*parC*、*parE*) を Dye-terminator cycle sequencing 法により解析した⁵⁴⁻⁵⁶⁾。シーケンス解析に用いたプライマーを Table3 に示した。PCR の反応条件は、*gyrA* および *parC* を denature: 94°C 30 秒、annealing: 63°C 30 秒、extension: 72°C 1 分を 1 サイクルとして 30

サイクル実施した。また、*gyrB* は 25 サイクルの denature: 94°C 1 分、annealing: 62°C 30 秒、extension: 72°C 45 秒とし、*parE* は 94°C 30 秒、72°C 1 分を 1 サイクルとして 25 サイクル実施した。得られた遺伝子増幅産物は、Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit (Beckman Coulter) および Genomelab™ GeXP GeXP ICEQ Genetic Analysis System (Beckman Coulter) を用いて解析した。

6. real time PCR 法を用いた薬剤排出ポンプおよび D2 ポーリンの

mRNA 発現解析

Piperacillin かつ levofloxacin に耐性を獲得した *P. aeruginosa* 株に対して、薬剤排出ポンプをコードする *mexA*、*mexY* および *mexC*、D2 ポーリンをコードする *oprD* の mRNA の発現量を測定した。すなわち Aurum™ Total RNA Mini Kit (BIO-RAD) を用いて total RNA を抽出し、BioSpec-nano (島津製作所) にて RNA 濃度を確認した。iQ™ Universal SYBR® Green One-Step Kit (BIO-RAD)、CFX Connect™ Real-Time System (BIO-RAD) および Table 3 のプライマーを用いて^{55,57,59,69}、mRNA の相対発現量を比較した。また、相対発現量解析は、内部コントロールとして PSD7 (Table 3) を用いて補正し⁵⁸、親株を 1 とした相対定量値で比較した。本検討では、*mexA* の発現量が 2 倍以上、*mexY* および *mexC* に関しては 5 倍以上を示した場合に亢進とした^{70,71}。また、*oprD* は 0.7 倍以下を発現低下と定義した⁵⁹。

7. 薬剤排出ポンプ (*mexAB-oprM*) の制御遺伝子 (*mexR*) の

DNA シーケンス解析

mexA の制御遺伝子である *mexR* の DNA シーケンスを実施した。実施手順は、『本章 第 2 節 実験材料および方法 5. DNA シーケンス法によるキノロン耐性決定領域 (QRDR) の遺伝子解析』と同様とした。*mexR* 遺伝子の増幅に用いたプライマーの塩基配列⁷²⁾を Table 3 に示した。

8. *In vitro* 薬剤排出ポンプ阻害薬による MIC 評価

薬剤排出ポンプの発現亢進がみられた *P. aeruginosa* 3 株に対し、薬剤排出ポンプ阻害薬 (efflux pump inhibitor: EPI) を使用した場合の MIC 変化を確認した。EPI は、carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP: 富士フィルム和光純薬)、phenylalanine-arginine- β -naphthylamide (PA β N: Sigma-aldrich) を用いた。100 μ M CCCP, 20 μ g/mL PN β Nを各々に含有した微量液体希釈法にて、piperacillin と levofloxacin の薬剤感受性を測定した^{73, 74)}。

第 3 節 結果

1. 薬剤感受性試験

条件検討された *P. aeruginosa* 20 株に対する各種抗菌薬の MIC range は、piperacillin: 0.125-4 μ g/mL、tazobactam/piperacillin: 0.125-8 μ g/mL、ceftazidime:

0.125-4 µg/mL, meropenem: 0.016-1 µg/mL, levofloxacin : 0.031-0.5 µg/mL, amikacin: 0.25-4 µg/mL であり、全ての菌株に感受性が確認された (Table 5)

2. H₂O₂ および piperacillin 負荷による多剤耐性獲得と抗 ROS 薬の抑制効果

Piperacillin + H₂O₂ の負荷により piperacillin と levofloxacin の多剤耐性を示した *P. aeruginosa* 株は、20 株中 4 株 (20%: Pa-2, 12, 16, 18) であった。また、piperacillin 単独負荷により多剤耐性獲得をした菌株は 2 株確認された (Table 6)。これら *P. aeruginosa* 4 株は全て、DHL-His-Zn の添加により、その多剤耐性化が抑制された。

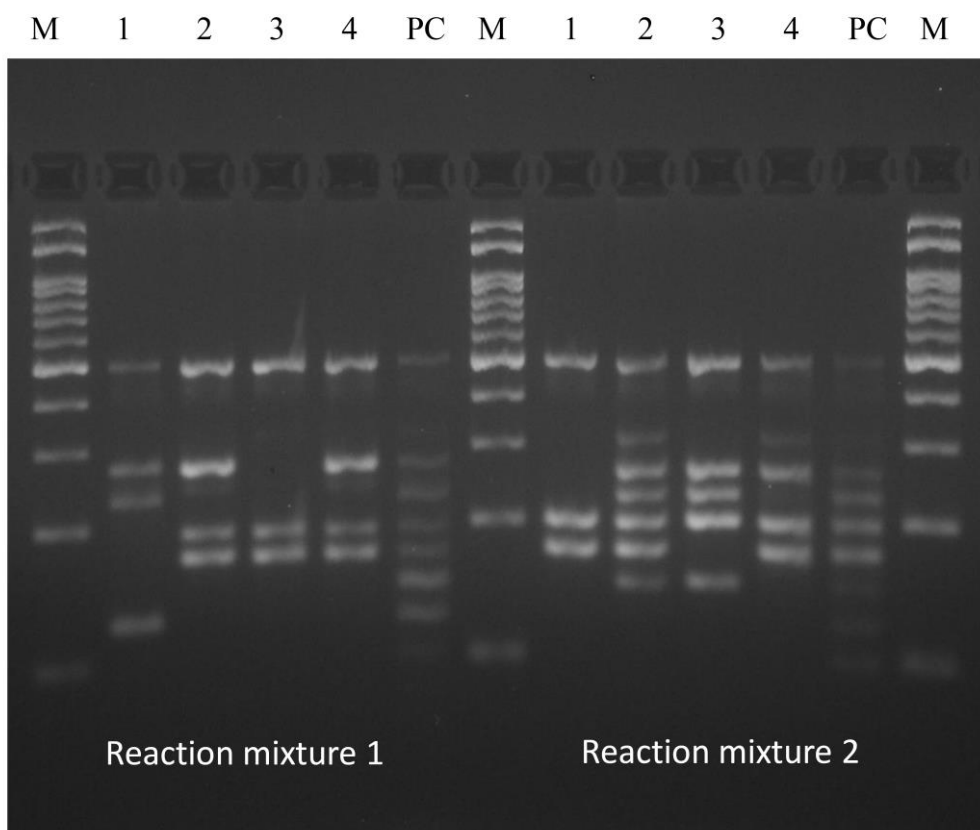
Table 6 Inhibitory effect by DHL-His-Zn addition to four strains that acquired multi-drug resistance by exposure to piperacillin plus ROS (H₂O₂)

Strain no.	MIC (µg/mL)											
	None (WT)		DHL		H ₂ O ₂		PIPC		PIPC + H ₂ O ₂		PIPC + H ₂ O ₂ + DHL	
	PIPC	LVFX	PIPC	LVFX	PIPC	LVFX	PIPC	LVFX	PIPC	LVFX	PIPC	LVFX
Pa-2	4	0.25	4	0.5	4	1	32	1	32	2	8	0.5
Pa-12	2	0.25	4	0.25	4	0.5	8	0.25	128	2	16	0.5
Pa-16	4	0.5	4	0.5	4	0.5	64	2	128	2	64	1
Pa-18	4	0.5	4	0.5	4	0.5	64	2	64	2	32	0.5

PIPC: piperacillin, LVFX: levofloxacin, DHL: DHL-His-Zn

3. PCR-based ORF typing method (POT 法)

Pa-2、12、16、18 の親株 4 株に関する、POT 法によるアガロースゲル電気泳動の結果を Fig. 9 に示す。これらの株の遺伝子パターンは全て異なっていた。



M: size maker, 1: Pa-2, 2: Pa-12, 3: Pa-16, 4: Pa-18, PC: positive control

Fig. 9 Agarose gel electrophoresis patterns of PCR-based ORF typing for 4 wild type strains

4. DNA シーケンス法によるキノロン耐性決定領域 (QRDR) の遺伝子解析

Piperacillin かつ levofloxacin に耐性を示した *P. aeruginosa* 4 株 (Pa-2、12、16、18) における QRDR の遺伝子変異は認められなかった。

5. real time PCR 法を用いた薬剤排出ポンプおよび D2 ポーリンの

mRNA 発現解析

多剤耐性を示した *P. aeruginosa* 4 株における *mexA*、*mexY*、*mexC* および *oprD* の mRNA の発現量を Table 7 に示す。これら 4 株中 3 株 (Pa-2、Pa-12、Pa-18) の *mexA* の発現量は、各々 7.12 倍、10.84 倍、4.59 倍に上昇した。また、*mexY* は 5.08-9.85 倍、*mexC* は 5.00-11.84 倍に発現亢進が確認された。一方、Pa-16 株は *oprD* の発現量が 0.55 倍に低下していた。

DHL-His-Zn 添加により、*P. aeruginosa* 4 株に対する各遺伝子の mRNA 発現量は、親株と同等に回復する傾向がみられた (Table 7)。*mexA* の発現量は DHL-His-Zn 添加により、Pa-18 は 1.06 倍に低下したが、Pa-2、12 では、各々 4.2 倍、3.41 倍に発現が亢進したままであった。また、*mexY*、*mexC* については 3 株 (Pa-2、Pa-12、Pa-18) とともに 5 倍未満を示した。Pa-16 の *oprD* 発現量は、DHL-His-Zn 添加時は 1.11 倍であった。

Table 7 Changes of mRNA expression encoding efflux pumps or D2 porin, and the recovery effect by DHL-His-Zn

Strain no.	Relative gene expression (fold)							
	<i>mexA</i>		<i>mexY</i>		<i>mexC</i>		<i>oprD</i>	
	HP*	HPD**	HP*	HPD**	HP*	HPD**	HP*	HPD**
Pa-2	7.12	→ 4.20	9.85	→ 3.49	11.16	→ 4.09	2.52	→ 0.98
Pa-12	10.84	→ 3.41	9.79	→ 4.03	11.84	→ 4.19	5.61	→ 1.52
Pa-16	0.49	→ 1.20	0.44	→ 1.42	0.54	→ 1.61	0.55	→ 1.11
Pa-18	4.59	→ 1.06	5.08	→ 2.16	5.00	→ 2.22	2.64	→ 0.50

*exposed to 1mM H₂O₂ + sub-MIC of piperacillin

**exposed to 1mM H₂O₂ + sub-MIC of piperacillin + 1mM DHL-His-Zn

6. 薬剤排出ポンプ (*mexAB-OprM*) の制御遺伝子 (*mexR*) の

DNA シーケンス解析

Piperacillin かつ levofloxacin に耐性を示した3株 (Pa-2、12、18) における *mexR* の塩基配列を解析したところ、各遺伝子の変異は認められなかった。

7. *In vitro* 薬剤排出ポンプ阻害薬による MIC 評価

薬剤排出ポンプをコードする *mexA*、*mexY*、*mexC* の発現亢進がみられた 3 株 (Pa-2、12、18) に対し、100 μ M CCCP または 20 μ g/mL Pa β N 添加後の MIC 変化を Table 8 に示した。CCCP 添加後の piperacillin の MIC は 3 株とも 1/2–1/32 倍の低下を示し、Pa-12, 18 株に対する levofloxacin の MIC は、各々 1/4、1/2 倍に減少した。また、3 株全てに対する Pa β N の添加後の MIC 値は、piperacillin: 1/4–1/16 倍、levofloxacin: 1/16–1/32 倍に低下した。

Table 8 MIC change by each efflux pump inhibitor

Strain no.	MIC(μ g/mL)							
	piperacillin				levofloxacin			
	CCCP (-)	CCCP (+)	PA β N (-)	PA β N (+)	CCCP (-)	CCCP (+)	PA β N (-)	PA β N (+)
Pa-2	16	8	32	8	2	2	2	0.125
Pa-12	128	4	64	8	4	1	2	0.125
Pa-18	64	32	64	4	2	1	2	<0.063

CCCP: carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone

Pa β N: phenylalanine-arginine- β -naphthylamide

第4節 考 察

臨床株を用いた本検討では、多剤耐性を獲得した4株中1株がD2ポーリンの発現低下を示した。Piperacillin と levofloxacin はともに D2 ポーリンを通過する⁷⁵⁾ことが知られており、薬剤の菌体内への移行が抑制され交差耐性を示したと思われた。

また他の3株では *mexA*、*mexY*、*mexC* の発現亢進が確認された。これらの遺伝子にコードされている MexAB-OprM、MexCD-OprJ および MexXY は、β-ラクタム系薬とフルオロキノロン系薬を排出するポンプである^{75, 76)}。ROS および piperacillin の負荷により、これらポンプの発現亢進が piperacillin と levofloxacin の菌体外排出をもたらし、多剤耐性を獲得したと示唆された。

これらの薬剤排出ポンプにおける薬剤の輸送機構は、プロトン (H^+) 勾配を利用した能動輸送である^{77, 78)}。今回の成績では、薬剤排出ポンプの発現亢進がみられた3株における levofloxacin の MIC は PAβN の添加により 1/16–1/32 倍に低下したが、CCCP 添加時には 1-1/4 倍にとどまった。PAβN は薬剤排出ポンプにおいて、主にフルオロキノロン系薬の排出過程を競合的に阻害する⁷⁸⁾。したがって、PAβN が菌体外へ排出され levofloxacin が菌体内へ留まることから、本検討でも既報告^{74, 79, 80)}と同様に levofloxacin の MIC が顕著に低下したと考えられた。一方、CCCP は脱共役剤として知られている。細菌の細胞膜外は H^+ 濃度が高く、薬剤排出ポンプは、 H^+ を菌体内に取り込む代わりに抗菌薬を菌体外へ

排出する。CCCP は、この H^+ を捕獲し H^+ の濃度勾配を低下させる。こうしてポンプの駆動力を低下させ、薬剤の排出速度が遅延することにより、菌体内の薬物濃度が上昇する^{77,81)}。CCCP の作用は薬剤選択性に乏しく、排出ポンプ全体の活性を間接的に低下させるため、今回、CCCP による MIC の低下幅が小さかったと思われた。本検討において、EPI (PA β N、CCCP) の添加により、levofloxacin または piperacillin の MIC が回復したことは、これら 3 株の耐性機序が薬剤排出ポンプによることを支持した。

今回の *in vitro* 耐性獲得試験は検討期間が 5 日間であったため、誘導されたキノロン耐性株には QRDR の遺伝子変異が確認されなかった。しかしながら、臨床的に考えると膿胸、複雑性腎盂腎炎、敗血症などの感染症では抗菌薬の投与が長期化するため、ROS が相乗的に影響し、その遺伝子変異が誘発される可能性がある。こうした変異株では levofloxacin の MIC はより高い値を示し、その感受性は継代培養を繰り返しても回復しない⁸²⁾。Piperacillin は β ラクタマーゼ阻害剤を配合した薬剤も臨床で汎用されているが、使用期間が長期化した場合、今回示したような排出ポンプの亢進など、QRDR の遺伝子変異とは別の機序でも多剤耐性株が出現する可能性があり、注意が必要である。

最後に、本検討において ROS の添加により緑膿菌の多剤耐性株の出現頻度が高くなることが明らかになり、酸化ストレスは耐性獲得の重要な因子であることが示唆された。感染部位において、菌体が白血球由来の H_2O_2 にさらされても、抗菌薬投与前に *P. aeruginosa* の薬剤耐性が生じるとは考えにくく、 H_2O_2 は耐性

獲得の促進因子のように機能しており、その単独負荷では MIC は上昇しない (Table 6)。また、H₂O₂ は *P. aeruginosa* が産生するカタラーゼにより速やかに分解されることが予想され、今回の 5 日間の暴露では薬剤耐性を誘発する変異原にはならなかったと考えられた。今回の検討では、4 株中 2 株が piperacillin の負荷のみでも多剤耐性を獲得した。抗菌薬曝露による耐性獲得は以前より知られていたが、piperacillin に H₂O₂ を添加することで、MIC がより上昇し多剤耐性株の出現頻度が増加したことは大変興味深い。

さらに、抗 ROS 薬を用い酸化ストレスを軽減することで 4 株の多剤耐性化は全て抑制され、*oprD* および *mexA*、*mexY*、*mexC* の発現量は親株に近い状態へと回復する傾向がみられた。本検討で抗 ROS 薬として用いた DHL-His-Zn は、フリーラジカルを直接不活性化する抗酸化作用を持つ⁸³⁾ α-リポ酸の誘導体である。この DHL-His-Zn は、皮膚におけるメラニン生成抑制および癌化学療法時の脱毛抑制の外用剤として実用化されている^{50, 84)}。また、*in vivo* のラット腎虚血再灌流モデルでは、DHL-His-Zn を持続注入することで腎障害が軽減したと報告されている⁵¹⁾。したがって、DHL-His-Zn は血流により体内へ分布し、感染部位に到達することが可能であると思われる。しかしながら、今回の検討から 3 株中 2 株の *mexA* 遺伝子の発現抑制が不完全であったため、より効果が強い抗 ROS 薬の開発は多剤耐性菌の出現抑制に重要であるだろう。

結語として、*P. aeruginosa* は MIC 以下の低濃度の piperacillin と ROS にさらされた場合、levofloxacin へ交差耐性を示す多剤耐性株が 20%程度出現することが

示された。また抗 ROS 薬である DHL-His-Zn の添加は、こうした多剤耐性を
全て抑制したことから、抗 ROS 剤は *P. aeruginosa* の多剤耐性を抑制する物質
として有用かもしれない。

総 括

抗菌薬により細菌感染症の治療成績は著しく向上した一方で、MRSA や ESBL 産生グラム陰性桿菌、CRE、MDRP、MDRAB などの薬剤耐性菌が問題となっている。こうした状況の中、2015 年に WHO において Antimicrobial resistance (AMR) global action plan が、2016 年に本邦では AMR 対策アクションプランが公表された。

本研究の第 1 章では「薬剤感受性調査」として、多剤耐性アシネトバクター属菌や MBL 産生大腸菌など、多剤耐性を示すグラム陰性桿菌に対し、2012 年 9 月に海外から緊急導入された tigecycline の抗菌力を調査した。Tigecycline は ESBL 産生株を含む *E. coli*、ESBL 産生 *Klebsiella* spp.、imipenem および ciprofloxacin の 2 剤耐性株を含む *A. baumannii*、欧米では適応菌種である MRSA に対しても高い感受性を示した。一方、MDRP を含む *P. aeruginosa* や ESBL 産生 *P. mirabilis* に対する感受性は低かった。また vancomycin 低感受性が示された MRSA に対しては、tigecycline の感受性低下がみられた。

Tigecycline の薬剤感受性成績は、本邦の臨床分離株についても欧米と同様であり、本剤は、テトラサイクリン系薬に自然耐性を示すとされる *P. aeruginosa* や *P. mirabilis* を除いては、多剤耐性グラム陰性桿菌の治療薬として有用であると思われた。なお、tigecycline は静菌的薬剤であるため重症感染症に対する使

用には慎重な判断が必要とされ、また、*P. aeruginosa* の混合感染例では、他剤と併用する必要がある点に留意すべきである。

MDRP に起因する感染症の治療薬は、colistin など極めて限定されるが、新薬の研究開発には莫大な費用と時間を要する。したがって、既存薬の有効利用が重要となるため、第2、3章では tigecycline の薬剤感受性が低く、医療関連感染の起因菌となる *P. aeruginosa* を対象菌種として用い、その多剤耐性獲得機序と活性酸素種 (ROS) の影響、および抗 ROS 薬の耐性獲得抑制効果について検討した。

感染症の治療において、菌は一定時間、MIC 以下の抗菌薬および白血球などから放出される ROS にも暴露される。第2章では *P. aeruginosa* PAO1 (標準株) を用い、代表的な抗緑膿菌薬への曝露に ROS を加えて *in vitro* 耐性誘導試験を実施し、piperacillin 負荷が自身の耐性に加え levofloxacin の交差耐性を誘導することを示した。

この多剤耐性株では D2 ポーリンをコードする *oprD* の mRNA の発現量が低下し、QRDR の ParE にアミノ酸変異が確認された。また piperacillin 耐性および levofloxacin への交差耐性獲得は、抗 ROS 薬である α -リポ酸誘導体 (DHL-His-Zn) の添加により抑制された。したがって、ROS による酸化ストレスが PAO1 株における多剤耐性化を促す重要な因子であることが示唆された。

第3章では、*P. aeruginosa* 臨床分離株 20 株を用い、第2章の傾向の有無と耐性株の出現頻度について検討した。Piperacillin および levofloxacin の多剤耐性を獲得した株は、20 株中 4 株（20%）であった。これら 4 株は、QRDR の遺伝子変異は確認されなかったが、薬剤排出ポンプをコードする *mexA*、*mexY*、*mexC* の発現亢進を示した株が 3 株、*oprD* の発現低下が 1 株に認められた。

本検討では、piperacillin 負荷が levofloxacin の交差耐性を誘導し、他のβ-ラクタム系薬の meropenem と ceftazidime ではこうした傾向は確認されなかった。Ceftazidime を排出する主な薬剤排出ポンプは MexAB-OprM であるが、piperacillin は 3 種類のポンプ (MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexXY-OprM) から排出される。フルオロキノロン系薬はこれら全てのポンプから排出されることが知られている。したがって piperacillin の負荷により 3 種類のポンプ全てが同時に発現亢進したため、フルオロキノロン系薬に交差耐性を獲得したと考えられた。また meropenem の負荷株は、その強力な作用により早急に殺菌されたため耐性が生じなかったと考えられた。

多剤耐性を獲得した 4 株の遺伝子型の相同性や、その他の株との違いは確認されなかったが、これらの株の多剤耐性化も PAO1 株同様に、DHL-His-Zn の添加により抑制された。したがって ROS は *P. aeruginosa* 臨床分離株の 2 割で多剤耐性化を助長することが明らかになった。

DHL-His-Zn は代表的な他の抗 ROS 薬である ascorbic acid や glutathione と比較し、優れた多剤耐性獲得抑制効果を示した。また、同剤は酸化ストレスを軽減することで癌化学療法後の脱毛を抑制するなど、すでに外用薬として臨床応用されており、ラットを用いた *in vivo* 試験結果より、血流により感染部位へ分布すると考えられる。白血球由来の ROS 作用軽減による殺菌効果減弱の可能性については、DHL-His-Zn の使用による感染発生頻度の増加は報告されておらず、貪食作用や抗菌薬感受性維持により補完されうると考えられた。また、現時点で DHL-His-Zn を内服で用いた検討はみられず、*in vivo* で使用可能な用量設定なども含め今後さらなる検討が必要ではあるが、抗 ROS 薬はラジカルスカベンジャーとして酸化ストレスを軽減し、多剤耐性化を抑制する抗菌化学療法の補助薬として期待された。

謝 辞

本研究を行うにあたり終始、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 臨床感染症学教室 教授 藤村 茂先生

に心より感謝申し上げます。

本論文の作成にあたり、御校閲、御助言を賜りました、感染生体防御学教室

教授 柴田信之先生、微生物学教室 教授 久下周佐先生に深く感謝申し上げます。

す。

研究に必要な種々の御指導・御助言を賜りました臨床感染症学教室の

古川恵美子先生（現 研究支援課）、河村真人先生をはじめ教室の皆様に厚く感

謝申し上げます。

本研究において対し、ご支援を賜りました理事長・学長 高柳元明 博士に

深く感謝の意を表します。

最後に本研究を行うにあたり、終始支援を賜りました東北医科薬科大学病院

の同僚の方々、家族、友人をはじめとする皆様に心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) O'Neill J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance. December 2014.
https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf [Accessed 17 October 2018].
- 2) 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議. 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン *National Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020*.
平成 28 年 4 月 5 日
<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000120769.pdf> [Accessed 17 October 2018].
- 3) 生方公子、紺野昌俊、沢井 稔、斉藤洪太、柳瀬 義男、高橋洋子、藤井良知.
最近の重症ブドウ球菌感染症に対する疫学的研究 第1編:分離したブドウ球菌の各種抗生物質に対する感受性とその β -lactamaseについて. 小児科臨床. 30, 865-76 (1977)
- 4) 鈴木明子、小林寛伊. わが国の感染制御の歴史. 医療関連感染. 8, 1-9 (2015)
- 5) Yanagihara K, Watanabe A, Aoki N, Matsumoto T, Yoshida M, Sato J, Wakamura T, Sunakawa K, Kadota J, Kiyota H, Iwata S, Kaku M, Hanaki H, Ohsaki Y, Fujiuchi S,

Takahashi M, Takeuchi K, Takeda H, Ikeda H, Miki M, Nakanowatari S, Takahashi H, Utagawa M, Nishiya H, Kawakami S, Morino E, Takasaki J, Mezaki K, Chonabayashi N, Tanaka C, Sugiura H, Goto H, Saraya T, Kurai D, Katono Y, Inose R, Niki Y, Takuma T, Kudo M, Ehara S, Sato Y, Tsukada H, Watabe N, Honma Y, Mikamo H, Yamagishi Y, Nakamura A, Ohashi M, Seki M, Hamaguchi S, Toyokawa M, Fujikawa Y, Mitsuno N, Ukimura A, Miyara T, Nakamura T, Mikasa K, Kasahara K, Ui K, Fukuda S, Nakamura A, Morimura M, Yamashita M, Takesue Y, Wada Y, Sugimoto K, Kusano N, Nose M, Mihara E, Kuwabara M, Doi M, Watanabe Y, Tokuyasu H, Hino S, Negayama K, Mukae H, Kawanami T, Ota T, Fujita M, Honda J, Hiramatsu K, Aoki Y, Fukuoka M, Magarifuchi H, Nagasawa Z, Kaku N, Fujita J, Higa F, Tateyama M. Nationwide surveillance of bacterial respiratory pathogens conducted by the surveillance committee of Japanese Society of Chemotherapy, the Japanese Association for Infectious Diseases, and the Japanese Society for Clinical Microbiology in 2012: General view of the pathogens' antibacterial susceptibility. *J Infect Chemother.* 23, 587-97 (2017)

- 6) Ministry of Health, Labor and Welfare. Japan nosocomial infections surveillance (JANIS): Annual Open Report 2017.

https://janis.mhlw.go.jp/report/open_report/2017/3/1/ken_Open_Report_20

1700.pdf [Accessed 8 December 2018].

https://janis.mhlw.go.jp/report/open_report/2017/3/2/zen_Open_Report_201700.pdf [Accessed 8 December 2018].

- 7) European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2017.

<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AMR-surveillance-EARS-Net-2017.pdf> [Accessed 8 December 2018].

- 8) Ministry of Health, Labor and Welfare. Japan nosocomial infections surveillance (JANIS): Annual Open Report 2010.

https://janis.mhlw.go.jp/report/open_report/2010/3/1/ken_Open_Report_201000_rep.pdf [Accessed 8 December 2018].

- 9) Takesue Y, Kusachi S, Mikamo H, Sato J, Watanabe A, Kiyota H, Iwata S, Kaku M, Hanaki H, Sumiyama Y, Kitagawa Y, Mizuguchi T, Ambo Y, Konosu M, Ishibashi K, Matsuda A, Hase K, Harihara Y, Okabayashi K, Seki S, Hara T, Matsui K, Matsuo Y, Kobayashi M, Kubo S, Uchiyama K, Shimizu J, Kawabata R, Ohge H, Akagi S, Oka M, Wakatsuki T, Suzuki K, Okamoto K, Yanagihara K. Antimicrobial susceptibility of pathogens isolated from surgical site infections in Japan: Comparison of data from nationwide surveillance studies conducted in 2010 and

2014-2015. *J Infect Chemother.* 23, 339-48 (2017)

- 10) Del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Cabot G, Rivera A, Benito N, Segura C, Montero M M, Sorlí L, Tubau F, Gómez-Zorrilla S, Tormo N, Durá-Navarro R, Viedma E, Resino-Foz E, Fernández-Martínez M, González-Rico C, Alejo-Cancho I, Martínez JA, Labayru-Echverria C, Dueñas C, Ayestarán I, Zamorano L, Martinez-Martinez L, Horcajada J P, Oliveraet A. Genomics and susceptibility profiles of extensively drug-resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 61, e01589-17 (2017)
- 11) Magiorakos A P, Srinivasan A, Carey R B, Carmeli Y, Falagas M E, Giske C G, Harbarth S, Hindler J F, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson D L, Rice L B, Stelling J, Struelens M J, Vatopoulos A, Weber J T, Monnet D L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 18, 268-81 (2012)
- 12) O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. The Review on Antimicrobial Resistance. May 2016. https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf [Accessed 4 July 2018].

- 13) Olson M W, Ruzin A, Feyfant E, Rush T S 3rd, O'Connell J, Bradford P A.
Functional, biophysical, and structural bases for antibacterial activity of tigecycline.
Antimicrob Agents Chemother. 50, 2156-66 (2006)
- 14) Hirata T, Saito A, Nishino K, Tamura N, Yamaguchi A. Effects of efflux transporter genes on susceptibility of *Escherichia coli* to Tigecycline (GAR-936). *Antimicrob Agents Chemother.* 48, 2179-84 (2004)
- 15) Souli M, Kontopidou F V, Koratzanis E, Antoniadou A, Giannitsioti E, Evangelopoulou P, Kannavaki S, Giamarellou H. *In vitro* activity of tigecycline against multiple-drug-resistant, including pan-resistant, gram-negative and gram-positive clinical isolates from Greek hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 50, 3166-9 (2006)
- 16) Petersen P J, Jacobus N V, Weiss W J, Sum P E, Testa R T. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of a novel glycylicline, the 9-*t*-butylglycylamido derivative of minocycline (GAR-936). *Antimicrob Agents Chemother.* 43, 738-44 (1999)
- 17) 三嶋 廣繁、藤村 茂、渡辺晋一. チゲサイクリン適正使用のための手引き
2014. 日化療会誌. 62, 311-66 (2014)
- 18) Fujimura S, Nakano Y, Watanabe A. A correlation between reduced susceptibilities to vancomycin and daptomycin among the MRSA isolates selected in mutant

- selection window of both vancomycin and daptomycin. *J Infect Chemother.* 20, 752-6 (2014)
- 19) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Third Informational Supplement. CLSI Document M100-S23. Wayne, PA, USA, 2013.
- 20) United States Food and Drug Administration (FDA). Highlights of prescribing information Tygacil.
http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/021821s021lbl.pdf
[accessed 14 July 2015].
- 21) Papaparaskevas J, Tzouvelekis L S, Tsakris A, Pittaras T E, Legakis N J: Hellenic Tigecycline Study Group. *In vitro* activity of tigecycline against 2423 clinical isolates and comparison of the available interpretation breakpoints. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 66, 187-94 (2010)
- 22) Reynolds R, Potz N, Colman M, Williams A, Livermore D, MacGowan A: BSAC Extended Working Party on Bacteraemia Resistance Surveillance. Antimicrobial susceptibility of the pathogens of bacteraemia in the UK and Ireland 2001–2002: the BSAC Bacteraemia Resistance Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother.* 53, 1018-32 (2004)

- 23) Milatovic D, Schmitz F J, Verhoef J, Fluit A C. Activities of the glycyclcline tigecycline (GAR-936) against 1,924 recent European clinical bacterial isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 47, 400-4 (2003)
- 24) Betriu C, Rodríguez-Avial I, Sánchez B A, Gómez M, Álvarez J, Picazo J J: Spanish Group of Tigecycline. *In vitro* activities of tigecycline (GAR-936) against recently isolated clinical bacteria in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 46, 892-5 (2002)
- 25) Sader H S, Farrell D J, Flamm R K, Jones R N. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009-2011). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 78, 443-8 (2014)
- 26) Özkök S, Togan T, Yesilkaya A, Timurkaynak F, Azap Ö K, Arslan H. *In vitro* susceptibility of tigecycline against multidrug-resistant gram-negative strains: Etest versus agar dilution. *Chemother.* 60, 151-6 (2014)
- 27) Castanheira M, Sader H S, Deshpande L M, Fritsche T R, Jones R N. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents*

Chemother. 52, 570-3 (2008)

- 28) 山口恵三, 大野 章, 石井良和, 舘田一博, 岩田守弘: レボフロキサシン
サーベイランスグループ. 2010年に全国72施設の臨床材料から分離された
12,866株の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス. *Jpn J Antibiot.* 65,
181-206 (2012)
- 29) Yong D, Shin H B, Kim Y K, Cho J, Lee W G, Ha G Y, Choi T Y, Jeong S H, Lee
K, Chong Y; KONSAR group. Increase in the prevalence of carbapenem-resistant
Acinetobacter isolates and ampicillin-resistant non-typhoidal *Salmonella* species in
Korea: A KONSAR Study Conducted in 2011. *Infect Chemother.* 46, 84-93 (2014)
- 30) Li Y, Lv Y, Xue F, Zheng B, Liu J, Zhang J. Antimicrobial resistance surveillance
of doripenem in China. *J Antibiot (Tokyo).* 68, 496-500 (2015)
- 31) Kaye K S, Pogue J M. Infections caused by resistant gram-negative bacteria:
epidemiology and management. *Pharmacother.* 35, 949-62 (2015)
- 32) Chen Y H, Lu P L, Huang C H, Liao C H, Lu C T, Chuang Y C, Tsao S M, Chen Y
S, Liu Y C, Chen W Y, Jang T N, Lin H C, Chen C M, Shi Z Y, Pan S C, Yang J L,
Kung H C, Liu C E, Cheng Y J, Liu J W, Sun W, Wang L S, Ko W C, Yu K W,
Chiang P C, Lee M H, Lee C M, Hsu G J, Hsueh P R. Trends in the susceptibility of
clinically important resistant bacteria to tigecycline: Results from the tigecycline *in*

- vitro* surveillance in Taiwan study, 2006 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother.* 56, 1452-7 (2012)
- 33) Chen L, Duan K. A PhoPQ-Regulated ABC transporter system exports tetracycline in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 60, 3016-24 (2016)
- 34) Dean C R, Visalli M A, Projan S J, Sum P E, Bradford P A. Efflux-mediated resistance to tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother.* 47, 972-8 (2003)
- 35) Garvey M I, Bradley C W, Tracey J, Oppenheim B. Continued transmission of *Pseudomonas aeruginosa* from a wash hand basin tap in a critical care unit. *J Hosp Infect.* 94, 8-12 (2016)
- 36) Sligl W I, Dragan T, Smith S W. Nosocomial gram-negative bacteremia in intensive care: epidemiology, antimicrobial susceptibilities, and outcomes. *Int J Infect Dis.* 37, 129-34 (2015)
- 37) Micek S T, Wunderink R G, Kollef M H, Chen C, Rello J, Chastre J, Antonelli M, Welte T, Clair B, Ostermann H, Calbo E, Torres A, Menichetti F, Schramm G E, Menon V. An international multicenter retrospective study of *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial pneumonia: impact of multidrug resistance. *Crit Care.* 19 (219), 1-8 (2015)

- 38) Tsai M H, Wu T L, Su L H, Lo W L, Chen C L, Liang Y H, Chiu C H. Carbapenem-resistant-only *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients formerly infected by carbapenem-susceptible strains. *Int J Antimicrob Agents*. 44, 541-5 (2014)
- 39) Alcalá-Franco B, Montanari S, Cigana C, Bertoni G, Oliver A, Bragonzi A. Antibiotic pressure compensates the biological cost associated with *Pseudomonas aeruginosa* hypermutable phenotypes *in vitro* and in a murine model of chronic airways infection. *J Antimicrob Chemother*. 67, 962-9 (2012)
- 40) Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed Res Int*. 2475067 (2016)
- 41) Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbol*. 2 (65), 1-13 (2011)
- 42) Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front Microbiol*. 4 (422), 1-8 (2014)
- 43) Kohanski M A, Dwyer D J, Hayete B, Lawrence C A, Collins J J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*. 130, 797-810 (2007)
- 44) Dwyer D J, Kohanski M A, Collins J J. Role of reactive oxygen species in antibiotic

- action and resistance. *Curr Opin Microbiol.* 12, 482-9 (2009)
- 45) Kohanski M A, DePrist M A, Collins J J. Sub-lethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell.* 37, 311-20 (2010)
- 46) Händel N, Hoeksema M, Freijo Mata M, Brul S, ter Kuile B H. Effects of stress, reactive oxygen species, and the SOS response on *de novo* acquisition of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 60, 1319-27 (2015)
- 47) Jørgensen KM, Wassermann T, Jensen PØ, Hengzuang W, Molin S, Høiby N, Ciofu O. Sublethal ciprofloxacin treatment leads to rapid development of high-level ciprofloxacin resistance during long-term experimental evolution of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57, 4215-21 (2013)
- 48) Mandsberg L F, Ciofu O, Kirkby N, Christiansen L E, Poulsen H E, Høiby N. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. *Antimicrob Agents Chemother.* 53, 2483-91 (2009)
- 49) Hagiwara S, Teshima Y, Takahashi N, Koga H, Saikawa T, Noguchi T. New lipoic acid derivative drug sodium zinc dihydrolipoylhistidinate prevents cardiac dysfunction in an isolated perfused rat heart model. *Crit Care Med.* 39, 506-11 (2011)

- 50) Hagiwara S, Uchida T, Koga H, Inomata M, Yoshizumi F, Moriyama M, Kitano S, Noguchi T. The α -lipoic acid derivative sodium zinc dihydrolipoylhistidinate reduces chemotherapy-induced alopecia in a rat model: a pilot study. *Surg Today*. 41, 693-7 (2011)
- 51) Koga H, Hagiwara S, Kusaka J, Goto K, Uchino T, Shingu C, Kai S, Noguchi T. New α -lipoic acid derivative, DHL-HisZn, ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Surg Res*. 174, 352-8 (2012)
- 52) Kono Y, Inomata M, Hagiwara S, Hiratsuka T, Suzuki K, Koga H, Shiraishi N, Noguchi T, Kitano S. Antiproliferative effects of a new α -lipoic acid derivative, DHL-HisZnNa, in HT29 human colon cancer cells *in vitro*. *Expert Opin Ther Targets*. 16, S103-9 (2012)
- 53) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. European committee on antimicrobial susceptibility testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 7.1, 2017. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ [Accessed 4 July 2018].
- 54) Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance.

- Antimicrob Agents Chemother.* 45, 2263-8 (2001)
- 55) Hayakawa S, Furukawa E, Kawamura M, Kikuchi T, Hirano T, Watanabe A, Fujimura S. Exposure to reactive oxygen species and piperacillin leads to multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Clin Microbiol.* 5, 1000264 (2016)
- 56) Bhattacharya D, Dey S, Kadam S, Kalal S, Jali S, Koley H, Sinha R, Nag D, Kholkute S D, Roy S. Isolation of NDM-1-producing multidrug-resistant *Pseudomonas putida* from a paediatric case of acute gastroenteritis, India. *New Microbe and New Infect.* 5, 5-9 (2015)
- 57) Tomás M, Doumith M, Warner M, Turton J F, Beceiro A, Bou G, Livermore D M, Woodford N. Efflux pumps, OprD porin, AmpC β -lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 54, 2219-24 (2010)
- 58) Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, Kado Y, Nomoto K. Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.* 73, 32-9 (2006)
- 59) Xavier D E, Picão R C, Girardello R, Fehlberg L C, Gales A C. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in

- Brazil. *BMC Microbiol.* 10 (217), 1-7 (2010)
- 60) Winterbourn C C, Kettle A J. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal.* 18, 642-60 (2013)
- 61) Imlay J A, Linn S. Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J Bacteriol.* 169, 2967-76 (1987)
- 62) Ferrándiz M J, Martín-Galiano A J, Arnanz C, Zimmerman T, de la Campa A G. Reactive oxygen species contribute to the bactericidal effects of the fluoroquinolone moxifloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 60, 409-17 (2016)
- 63) Fraud S, Poole K. Oxidative stress induction of the MexXY multidrug efflux genes and promotion of aminoglycoside resistance development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 55, 1068-74 (2011)
- 64) Ciofu O, Riis B, Pressler T, Poulsen H E, Høiby N. Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrob Agents Chemother.* 49, 2276-82 (2005)
- 65) Chen H, Hu J, Chen P R, Lan L, Li Z, Hicks L M, Dinner A R, He C. The *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux regulator MexR uses an

- oxidation-sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105, 13586-91 (2008)
- 66) Choudhury D, Ghosh A, Chanda D D, Talukdar D A, Choudhury M D, Paul D, Maurya A P, Chakravarty A, Bhattacharjee A. Premature termination of MexR leads to overexpression of MexAB-OprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary referral hospital in India. *PLoS One*. 11, e0149156 (2016)
- 67) Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*. 288, 1251-4 (2000)
- 68) Suzuki M, Yamada K, Aoki M, Hosoba E, Matsumoto M, Baba H, Inuma Y. Applying a PCR-based open-reading frame typing method for easy genotyping and molecular epidemiological analysis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol*. 120, 487-97 (2015)
- 69) Morita Y, Murata T, Mima T, Shiota S, Kuroda T, Mizushima T, Gotoh N, Nishino T, Tsuchiya T. Induction of *mexCD-oprJ* operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Antimicrob Chemother*. 51, 991-4 (2003)
- 70) Bruchmann S, Dötsch A, Nouri B, Chaberny I F, Häussler S. Quantitative contributions of target alteration and decreased drug accumulation to *Pseudomonas*

- aeruginosa* fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 57, 1361-8 (2013)
- 71) Moyá B, Beceiro A, Cabot G, Juan C, Zamorano L, Alberti S, Oliver A. Pan- β -lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: molecular mechanisms, penicillin-binding protein profiles, and binding affinities. *Antimicrob Agents Chemother.* 56, 4771-8 (2012)
- 72) Braz V S, Furlan J P R, Fernandes A F T, Stehling E G. Mutations in NalC induce MexAB-OprM overexpression resulting in high level of aztreonam resistance in environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 363 (16), 1-6 (2016)
- 73) Nallathamby P D, Lee K J, Desai T, Xu X N. Study of multidrug membrane transporter of single living *Pseudomonas aeruginosa* cells using size-dependent plasmonic nanoparticle optical probes. *Biochemistry.* 49, 5942-53 (2010)
- 74) Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother.* 51, 4062-70 (2007)
- 75) Lister P D, Wolter D J, Hanson N D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded

- resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 22, 582-610 (2009)
- 76) Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44, 3322-7 (2000)
- 77) Paulsen I T, Brown M H, Skurray R A. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev.* 60, 575-608 (1996)
- 78) Askoura M, Mottawea W, Abujamel T, Taher I. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan J Med.* 6 (5870), 1-8 (2011)
- 79) Adamson D H, Krikstopaityte V, Coote P J. Enhanced efficacy of putative efflux pump inhibitor/antibiotic combination treatments versus MDR strains of *Pseudomonas aeruginosa* in a *Galleria mellonella in vivo* infection model. *J Antimicrob Chemother.* 70, 2271-8 (2015)
- 80) Lomovskaya O, Warren M S, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, Blais J, Cho D, Chamberland S, Renau T, Leger R, Hecker S, Watkins W, Hoshino K, Ishida H, Lee V J. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 105-16 (2001)

- 81) Adabi M, Talebi-Taher M, Arbabi L, Afshar M, Fathizadeh S, Minaeian S, Moghadam-Maragheh N, Majidpour A. Spread of efflux pump overexpressing-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by using an efflux pump inhibitor. *Infect Chemother.* 47, 98-104 (2015)
- 82) Nakai H, Sato T, Uno T, Furukawa E, Kawamura M, Takahashi H, Watanabe A, Fujimura S. Mutant selection window of four quinolone antibiotics against clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. *J Infect Chemother.* 24, 83-7 (2018)
- 83) Packer L, Tritschler H J, Wessel K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med.* 22, 359-78 (1997)
- 84) Tsuji-Naito K, Hatani T, Okada T, Tehara T. Modulating effects of novel skin-lightening agent, α -lipoic acid derivative, on melanin production by the formation of DOPA conjugate products. *Bioorg Med Chem.* 15, 1967-75 (2007)

論文目録

本論文の第1章から第3章の内容は、それぞれ以下の雑誌に公表した。

1. 早川幸子、藤村 茂、古川恵美子、河村真人、宇野浩一、佐藤寿夫、渡辺 彰

東北地方で臨床材料から分離された各種病原細菌に対するチゲサイクリン
の抗菌力.

日本化学療法学会雑誌, 2015; 63 (6): 576-9

2. Sachiko Hayakawa, Emiko Furukawa, Masato Kawamura, Toshiaki Kikuchi,

Taizou Hirano, Akira Watanabe, Shigeru Fujimura

Exposure to reactive oxygen species and piperacillin leads to multidrug resistance
in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Clinical Microbiology, 2016; 5: 1000264

3. Sachiko Hayakawa, Masato Kawamura, Takumi Sato, Taizou Hirano,

Toshiaki Kikuchi, Akira Watanabe, Shigeru Fujimura

An α -Lipoic acid derivative, and anti-ROS agent, prevents the acquisition of
multi-drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

Journal of Infection and Chemotherapy, 2019; 25: 28-33