

東北医科薬科大学

審査学位論文（博士）

氏名（本籍）	イトウ リョウタ 伊藤 亮太（宮城県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博薬学第 21 号
学位授与の日付	令和 5 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	ESBL 産生株を含む <i>Escherichia coli</i> における cefmetazole 耐性獲得とその抑制に関する研究
論文審査委員	主査 教授 大河原 雄一
	副査 教授 内田 龍児
	副査 教授 藤村 茂

ESBL 産生株を含む *Escherichia coli* における
cefmetazole 耐性獲得とその抑制に関する研究

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 薬学専攻博士課程

臨床感染症学教室

伊藤 亮太

目次

略語表	．．．．．3
序論	．．．．．5
第一章： <i>Escherichia coli</i> 臨床分離株に対する extended spectrum β -lactamase (ESBL) 産生株のスクリーニングおよび遺伝子の解析	
第一節	．．．．．9
第二節	．．．．．11
第三節	．．．．．14
第四節	．．．．．16
第二章：ESBL 産生 <i>Escherichia coli</i> における cefmetazole 耐性化メカニズムの 解明	
第一節	．．．．．19
第二節	．．．．．21
第三節	．．．．．25
第四節	．．．．．32
第三章：ESBL 産生 <i>Escherichia coli</i> における cefmetazole 耐性化抑制について	
第一節	．．．．．35

第二節	・ ・ ・ ・ ・ 37
第三節	・ ・ ・ ・ ・ 40
第四節	・ ・ ・ ・ ・ 44
総括	・ ・ ・ ・ ・ 47
謝辞	・ ・ ・ ・ ・ 50
引用文献	・ ・ ・ ・ ・ 51
論文目録	・ ・ ・ ・ ・ 66

略語表

以下の略語を本文および図表中で使用した。

AMED	: Japan Agency for Medical Research and Development
AMR	: Antimicrobial resistance
CAZ	: ceftazidime
CFU	: colony forming unit
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CMZ	: cefmetazole
CRE	: Carbapenem-resistant <i>Enterobacterales</i>
CTX	: cefotaxime
CVA	: clavulanate
EC	: <i>Escherichia coli</i>
ESBL	: Extended-spectrum β -lactamase
IDSA	: Infectious diseases society of America
MHA	: Muller-Hinton Agar
MHB	: Muller-Hinton broth

MIC : minimum inhibitory concentration

PBS : Phosphate Buffered Saline

R : cefmetazole resistant group

REL : relebactam

ROS : Reactive Oxygen Species

RT : reverse transcription

TAM : Time above MIC

WT : Wild Type

序 論

抗菌薬は 1940 年代以降に開発および臨床使用が進み、感染症治療は進歩してきた。その一方で、様々な抗菌薬に耐性を示す菌株が出現するようになり、今日に至るまで様々な薬剤耐性（Antimicrobial resistance : AMR）菌が世界中に蔓延している¹⁾。これに伴い、薬剤耐性菌による感染症は年々増加しており、米国では 2013 年の耐性菌による推定感染者数が約 200 万人以上/年にも上った²⁾。さらに、2019 年には約 300 万人以上/年へと上昇しており、3.5 万人以上/年が AMR に起因した死亡と推定されている。これは欧州でも同様であり、2015 年に年間 3.3 万人が AMR 関連で亡くなっている³⁾。薬剤耐性菌および感受性菌による感染症の死亡率を、黄色ブドウ球菌および *Escherichia coli* で比較した成績では、感受性菌に比して薬剤耐性菌の方が、死亡率は約 2 倍高いことが報告されており⁴⁾、AMR は多くの治療失敗と関連している。

このように AMR は世界的な脅威であり、特に近年ではカルバペネム耐性腸内細菌目細菌（Carbapenem-resistant *Enterobacterales* : CRE）など、カルバペネム系薬のみならず複数の抗菌薬にも耐性を示す細菌が出現している⁵⁾。日本における CRE の分離頻度は 0.5%未満とまだ低い⁶⁾、特に発展途上国において、その増加が問題となっており、今後の世界的な拡散が懸念されている。このような現状をふまえ、2019 年には米国疾病管理予防センターは公衆衛生上脅

威となる薬剤耐性菌のリストを作成しており⁷⁾、その中で CRE は「Urgent threats（切迫した脅威）」に位置付けられた。

他方、日本を含む世界で急増している基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (Extended-spectrum β -lactamase : ESBL) 産生腸内細菌目細菌や多剤耐性 *Pseudomonas aeruginosa*、バンコマイシン耐性腸球菌等は「Serious threats（深刻な脅威）」に位置付けられている (Table 1)。

Table 1 Microorganisms listed in the antimicrobial resistance threats report, 2019

Category	Pathogen
Urgent Threats	Carbapenem-resistant <i>Acinetobacter</i>
	<i>Candida auris</i> (<i>C. auris</i>)
	<i>Clostridioides difficile</i> (<i>C. difficile</i>)
	Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE)
	Drug-resistant <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (<i>N. gonorrhoeae</i>)
Serious Threats	Drug-resistant <i>Campylobacter</i>
	Drug-resistant <i>Candida</i>
	Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae
	Vancomycin-resistant <i>Enterococci</i> (VRE)
	Multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>P. aeruginosa</i>)
	Drug-resistant nontyphoidal <i>Salmonella</i>
	Drug-resistant <i>Salmonella</i> serotype Typhi
	Drug-resistant <i>Shigella</i>
	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)
	Drug-resistant <i>Streptococcus pneumoniae</i> (<i>S. pneumoniae</i>)
Drug-resistant Tuberculosis (TB)	
Concerning Threats	Erythromycin-resistant group A <i>Streptococcus</i>
	Clindamycin-resistant group B <i>Streptococcus</i>
Watch List	Azole-resistant <i>Aspergillus fumigatus</i> (<i>A. fumigatus</i>)
	Drug-resistant <i>Mycoplasma genitalium</i> (<i>M. genitalium</i>)
	Drug-resistant <i>Bordetella pertussis</i> (<i>B. pertussis</i>)

腸内細菌目細菌のうち、*E. coli* における ESBL 産生株の占める割合は 2018 年に欧州 17.9%、日本では 2015 年に 24.3%と報告されている^{8,9)}。こうした ESBL 産生 *E. coli* は院内感染のみならず、市中感染の原因としても注目されており^{10,11)}、医療機関において頻用されるペニシリン系、セファロスポリン系などの抗菌薬に耐性を示すことが知られている¹¹⁾。

ESBL 産生菌による感染症治療にはカルバペネム系薬、tazobactam/piperacillin や tazobactam/ceftolozane などの β ラクタマーゼ阻害剤配合 β ラクタム系薬の他、セファマイシン系薬の cefmetazole (CMZ) 等があるが選択できる抗菌薬は少ない。一般に敗血症などの重症感染症における第一選択薬はカルバペネム系薬であるが^{12,13)}、その多用による薬剤耐性化が懸念されており¹⁴⁾、日本では CMZ が初期治療薬として選択される機会が多い。しかしながら、CMZ 投与における薬剤耐性獲得に関する検討はほとんどされていない。

したがって、本研究では ESBL 産生 *E. coli* における CMZ の耐性獲得機序の解明とともに、その耐性獲得阻止について焦点をあて、以下の検討を行った。第一章では宮城県内における ESBL 産生株の現状把握を目的に、臨床分離された *E. coli* における ESBL 産生株のスクリーニングおよび関連遺伝子の解析を行った。第二章では、*E. coli* の *in vitro* 負荷モデルを作成し、CMZ 耐性獲得機序について検討した。第三章では同モデルを使用し、その耐性獲得を抑制する薬

剤について検討を行った。

第一章

Escherichia coli 臨床分離株に対する extended spectrum

β -lactamase (ESBL) 産生株のスクリーニングおよび遺伝子の解析

第一節 緒言

Escherichia coli は尿路感染症の主要な原因菌であるが、近年、AMR の獲得により治療が困難になる場合が増加している。*E. coli* をはじめとするグラム陰性桿菌の耐性機序として、菌体内における抗菌薬濃度の低下（薬剤排出ポンプの亢進や透過孔であるポーリンの減少又は欠損）や抗菌薬標的部位の変化、 β ラクタマーゼ産生による抗菌薬の不活化などが知られているが¹⁵⁾、最近では extended spectrum β -lactamase (ESBL) の産生が注目されている¹⁶⁾。

ESBL は、ペニシリナーゼの構造遺伝子の変異によりペニシリン系だけでなく、第3、4世代セファロスポリン系薬のほか、モノバクタム系薬をも分解する β ラクタマーゼである¹⁷⁾。また、ESBL 産生株の多剤耐性化が問題となっており、英国では ESBL 産生 *E. coli* の94%が ciprofloxacin または trimethoprim/sulfamethoxazole にも耐性を示すと報告された¹⁸⁾。ESBL をコードする遺伝子は主にプラスミド遺伝子上に存在し¹⁹⁾、菌種を超えて伝播すると考えられている。ESBL の特徴については未解明の部分が多いが、そのコードす

る遺伝子が明らかになってきた。

第一章では宮城県における現状把握を目的に、県内で臨床分離された *E. coli* を用いて、ESBL 産生株のスクリーニング及び遺伝子型を検討した。

第二節 実験材料および方法

2.1. 被検菌株と抗菌薬

被検菌株は、日本の宮城県内にある6つの医療施設から2019、2020年度に臨床分離された *Escherichia coli* 62株および *E. coli* 標準株 (ATCC 25922) の計63株を用いた。これら臨床分離株62株の主な検体由来は、尿55%、膿分泌物37%、その他(血液、便)8%であった。

抗菌薬は ceftazidime (CAZ: Sigma-Aldrich Co., LLC, Tokyo)、cefmetazole (CMZ: Sigma-Aldrich Co., LLC, Tokyo) を使用した。また、ESBL 産生株のスクリーニングのために CAZ、cefotaxime (CTX)、CAZ/ clavulanate (CAZ/CVA)、cefotaxime/ clavulanate (CTX/CVA) の KB ディスク (Eiken, Tokyo) を用いた。

2.2. CAZ 及び CMZ の抗菌薬感受性試験

E. coli 全63株に対する CAZ の最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) を微量液体希釈法により決定した。すなわち、Muller-Hinton Agar (MHA: Eiken) で37°C、24 hr 培養した *E. coli* を Phosphate Buffered Saline (PBS) を用いて McFarland no. 0.5 に調整し、この懸濁液5 µL を Muller-Hinton broth (MHB: Becton Dickinson, NJ) 1.5 mL に添加した。続いて、256-0.125 µg/mL

の範囲で作成した CAZ の希釈系列に菌液を 100 μ L ずつ接種し、37°C、16-20 hr 培養した。

また、対照として ESBL に分解されないセファマイシン系薬である CMZ の MIC を同様の操作で測定した。なお、感受性判定は CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) M100-S31 に準拠し²⁰⁾、各薬剤の MIC が CAZ : $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ 、CMZ : $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ を示した場合にそれぞれ耐性と判断した。

2.3. ESBL 産生株の確認試験

ESBL 産生の有無は、CLSI に準拠したディスク拡散法により確認した²⁰⁾。すなわち、薬剤感受性試験用ディスク CAZ 及び CTX と、各薬剤に CVA を加えた合剤 (CAZ/CVA 及び CTX/CVA) の阻止円直径を比較し、合剤による阻止円が単剤よりも 5 mm 以上拡大した場合、ESBL 産生株と判定した。

2.4. ESBL 遺伝子の解析

本実験では、確認試験において確定した ESBL 産生株を用いた。ESBL の遺伝子型を確認するため、ESBL 産生株のコロニーを milli-Q 水 500 μ L に懸濁後、遠心分離 (12000 rpm、2 min) を行った。その Pellets に InstaGene Matrix (Bio-Rad) を 100 μ L 添加して攪拌処理し、56°C で 30 min インキュベートした。続い

てヒートブロック（100°C、8 min）で加温したのち、遠心分離（12000 rpm、3 min）によって得られた上清をテンプレート DNA として使用した。

各 ESBL 遺伝子（CTX-M-1 group、CTX-M-2 group、CTX-M-8 group、CTX-M-9 group、CTX-M-25 group、CTX-M chimera、GES、TEM、SHV）は Cica Geneus[®] ESBL Genotype Detection KIT 2（Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo）を用いたマルチプレックス PCR 法にて決定した。その PCR の反応条件は 94°C で 2 min 反応後、denaturation 94°C で 15 sec、annealing 63°C で 15 sec、extension 72°C で 40 sec を 1 サイクルとして、計 30 サイクル実施した。PCR 産物は 2% アガロースゲルを用いて電気泳動（100 V、30 min）を行い、遺伝子増幅産物の有無を確認した。

第三節 結果

3.1. 抗菌薬感受性

被検菌株 62 株に対する CAZ の MIC range は 0.125 - 32 $\mu\text{g/mL}$ であり、8 株 (12.9%) が耐性を示した。一方、CMZ の MIC range は 0.5 - 4 $\mu\text{g/mL}$ であり、すべての株が感受性を示した (Table 2)。

Table 2 MICs of ceftazidime and cefmetazole for clinical isolates of *E. coli*

Antimicrobial agent	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
CAZ	0.125 - 32	0.5	1
CMZ	0.5 - 4	1	2

CAZ: ceftazidime, CMZ: cefmetazole

3.2. 被検菌株における ESBL 産生遺伝子の検出

被検菌株 62 株のうち、ディスク拡散法による ESBL 産生株確認試験によって、ESBL 産生と判定された株は 14 株 (22.6%) であった。これら 14 株の ESBL 産生遺伝子は、13 株が CTX-M 型を示し、このうち TEM 型の遺伝子も併せ持つ株が 5 株確認された (Table 3)。残り 1 株は、TEM 型のみを示す株であった。

Table 3 Genotypes of ESBL-producing *E. coli*

Strain No.	Genotypes
EC-2	CTX-M-9 group
EC-3	CTX-M-9 group
EC-4	CTX-M-9 group
EC-5	CTX-M-9 group
EC-7	CTX-M-1 group, TEM
EC-8	CTX-M-1 group, TEM
EC-13	CTX-M-9 group, TEM
EC-14	CTX-M-9 group
EC-15	CTX-M-9 group, TEM
EC-16	CTX-M-9 group
EC-20	CTX-M-9 group
EC-21	CTX-M-1 group, TEM
EC-23	TEM
EC-25	CTX-M-9 group

EC, *Escherichia coli*

第四節 考察

近年 ESBL 産生株に対する関心は強まっており、国内の日本医療研究開発機構 (AMED) 感染症創薬産学官連絡会では、既存薬での対応が難しく、早期に新薬の創出が望まれる細菌として ESBL 産生株は位置付けられている²¹⁾。

ESBL を産生する主な菌種は *E. coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Proteus* 属などの腸内細菌目細菌である²²⁾。同じ腸内細菌であっても引き起こす感染症は異なっており、*K. pneumoniae* は呼吸器感染症や腹腔内感染症からの検出がみられ²³⁾、*E. coli* は尿路感染症での検出が最も多い²⁴⁾。実際に、本研究で用いた *E. coli* 62 株のうち 34 株 (54.8%) が尿路検体由来であり、今回確認された ESBL 産生 *E. coli* では 14 株中 12 株 (85.7%) を占めていた。また、本検討において、*E. coli* における ESBL 産生株の占める割合は 22.6%であった。これは、わが国の 2015 年の成績⁹⁾ (24.3%) と概ね一致したことから、宮城県内における ESBL 産生株は全国と同程度に広く蔓延しているものと考えられた。

次に、本検討で検出された ESBL の遺伝子型について、ESBL 産生 *E. coli* 14 株中 10 株 (71.4%) が CTX-M-9 group を示した。CTX-M 型の ESBL には 200 類以上の亜型が知られており、世界的に CTX-M-1group、CTX-M-2 group、CTX-M-9 group が多くを占めている^{25,26)}。サブグループ解析では、CTX-M-1 group が世界規模で広く拡散しており、特に CTX-M-15 を産生する *E. coli* の検出頻度が増

加し、その病原性の強さも報告されている²⁷⁾。海外における CTX-M-1group は、主に腹腔内感染症からの分離頻度が高く²⁸⁾、そのため重篤な症例が多い。一方、日本では、主に CTX-M-9 group に属する ESBL 産生株が多く検出されている²⁹⁾。国内の尿路検体より検出された ESBL 産生 *E. coli* の遺伝子型は、CTX-M-9 group が 75.6%³⁰⁾を占め、実際にわが国で検出される ESBL 産生 *E. coli* は尿路感染症の起炎菌であることが多い³¹⁾。このことから CTX-M-9 group は、比較的軽症例が多い尿路から分離されやすい傾向にあると考えられた。日本の病院における院内感染対策は比較的高水準にあると考えられ、腹腔内感染症が尿路感染症に比して少ないことが CTX-M-9 group の検出率が高い理由と考えられた。

今回検出された TEM 型は、従来より ESBL 産生 *K. pneumoniae* から検出されることが多かったが、他のグラム陰性桿菌へも伝播が拡大している³²⁾。TEM 型のわが国における検出は CTX-M 型に比して少なく³⁰⁾、CTX-M 型と同様の第三代セファロスポリン系薬に対する分解能を有している³³⁾。今回の検討において、この TEM 型と CTX-M 型 (-1 or -9) を併せ持つ菌株が 14 株中 5 株 (35.7%) 確認された。TEM 型は、CTX-M 型などの耐性遺伝子と同時に産生されることによってセファロスポリン系の分解能が向上し、さらなる耐性化が報告されている³⁴⁾。実際に、これらの 5 株はいずれも CAZ にも耐性を示しており、2 種類の ESBL を産生することで分解効率が上昇したと考えられた。なお、ESBL に安定

である CMZ に対しては、こうした株も感受性を示した。また、国内では 2 種類以上の ESBL 関連遺伝子を保有する株が複数報告されている^{35,36)}。しかしながら、東北地方ではこのような報告は認めておらず、今回の検討において初めて確認された。さらに、複数の ESBL 関連遺伝子を保有する菌株では、特に血流感染において、重篤な症例が複数報告されている^{37,38)}。今後、こうした複数の耐性遺伝子を有する ESBL 産生株が増える可能性があるため、抗菌薬の適正使用のさらなる推進と院内における耐性菌の拡散防止に努めなければならない。

第二章

ESBL 産生 *Escherichia coli* における cefmetazole 耐性化メカニズムの解明

第一節 緒言

第一章では、近年増加する AMR のうち、特に *Escherichia coli* における ESBL 産生株の検出が増加しており、宮城県内でもその拡散が確認されたことを示した。ESBL 産生 *E.coli* は主に尿路、腹腔内あるいは血流感染症の原因菌として、高頻度に分離される^{39,40)}。このうち菌血症では非産生株による場合に比べて、死亡リスクが 2.9 倍上昇することが報告されている⁴¹⁾。その治療にあたっては、米国感染症学会 (Infectious diseases society of America: IDSA) の耐性菌治療ガイドラインにおいて、カルバペネム系薬やキノロン系薬、trimethoprim/sulfamethoxazole などが推奨されている⁴²⁾。特に重症例に対しては、ESBL に対し安定性が高いカルバペネム系薬が第一選択として推奨されており⁴³⁾、従来から世界中で使用されてきた⁴²⁻⁴⁴⁾。一方、わが国ではこれらの他に、セファマイシン系薬である cefmetazole が選択される。

ESBL 産生株に対するカルバペネム系薬の過剰な使用は、同薬に対する耐性菌の増加へと繋がる可能性があり^{45,46)}、その耐性化は治療に難渋し、高い致命率に

繋がる。カルバペネム系薬の乱用を抑えるため、わが国では軽～中等症例を中心に cefmetazole が用いられることが多く^{13,47-50)}、実際にその使用量は 2004 年に比して、2016 年では 1.21 倍に増加している⁵¹⁾。このように、わが国において cefmetazole の使用機会が多くなっているにもかかわらず、*E. coli* に対する耐性機序は明らかになっていない。こうした状況を鑑み、第二章では cefmetazole の耐性化メカニズムについて検討を行った。

第二節 実験材料および方法

2.1. 被検菌株と抗菌薬

被検菌株は、第一章において確認された ESBL 産生 *E. coli* 14 株と、対照として非産生 *E. coli* 12 株 (*E. coli* ATCC 25922 標準株含む) を使用した。

抗菌薬は cefmetazole (CMZ : Sigma-Aldrich Co., LLC, Tokyo) を使用した。

2.2. *In vitro* CMZ 耐性獲得実験

被検菌株に対する CMZ の MIC を微量液体希釈法により決定した。検討で用いた *E. coli* は MHA で 37°C、24 hr 培養した。PBS を用いて McFarland no. 0.5 に調整した菌液 5 μ L を MHB 1.5 mL に添加し、256-0.125 μ g/mL の範囲で作成した CMZ の希釈系列に 100 μ L ずつ接種後に 37°C、16-20 hr 培養した。

これらの菌株を CMZ に対する MIC 値に基づき、MIC \leq 1 μ g/mL および 2-4 μ g/mL の 2 群に分け *in vitro* 耐性獲得実験を行った。すなわち、96-well マイクロプレートに作成した CMZ の希釈系列 (2 MIC-1/4 MIC) に菌液を接種し、37°C、16-20 hr 培養した。MIC を決定した後、1/2 MIC に生残した菌株を新たに作成した希釈系列に接種し、MIC を再度決定した。この操作を計 10 日間繰り返した。なお、感受性判定は CLSI に準拠し²⁰⁾、CMZ の MIC : \geq 64 μ g/mL を耐性とした。

2.3. 耐性能維持試験および CMZ 再曝露試験

2.2.の実験において、10 日目に生残した菌株を、抗菌薬フリーの MHB を用いて 14 日間継代培養した。最後に、14 日目の菌株を 2.2.と同様の手順で、再び CMZ に 10 日間曝露させ、MIC の変化を確認した。

2.4. AMR 関連遺伝子の発現量比較

1 回目の CMZ 10 日間曝露後の株に対して、ポーリン (*ompC*、*ompF*、*phoE*)、染色体性 *ampC* および薬剤排出ポンプ (*acrA*、*yhiV*、*mdfA*) の各々の mRNA 発現量を real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) で測定した。

各菌株の total RNA の抽出は TRI REAGENT™ LS (Molecular Research Center, Inc. OH) を用い、フェノール抽出法で実施し、RNA 濃度は BioSpec-nano (Shimadzu Corporation, Kyoto) で確認した。mRNA 発現量は iTaq Universal SYBR Green One-Step Kit (Bio-Rad, Hercules, CA) を用い、CFX Connect™ Real-time System (Bio-Rad) を用いて測定した。用いた primer の配列を Table 4 に示す。各 mRNA 発現量は、各親株 (Wild Type : WT) の mRNA 発現量を 1 として解析した。なお、本検討では各遺伝子の発現量が 2 倍以上を発現亢進、0.5 倍以下を発現低下と定義した⁵⁵⁾。

Table 4. Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Reference
<i>ompF</i> -F	AAGTAGTAGGTTGCGCCCAC	52)
<i>ompF</i> -R	AGTTCGATTTTCGGTCTGCGT	
<i>ompC</i> -F	ATTCTGGCAGTACGTCCGGTC	52)
<i>ompC</i> -R	AAACAACCTCCTGGACCCGTG	
<i>phoE</i> -F	CAGGCTTCCACGTCATACAA	This study
<i>phoE</i> -R	TTATGGTCGTTGGGAAGCTG	
<i>ampC</i> -F	TCAAACCAGACGGCTTCACA	53)
<i>ampC</i> -R	GTCTGTATGCCAACTCCAGTATCG	
<i>acrA</i> -F	CTTAGCCCTAACAGGATGTG	54)
<i>acrA</i> -R	TCTTTGAAATTACGCTTCAGG	
<i>yhiV</i> -F	CCGTACCGGTGGTTATTCTC	54)
<i>yhiV</i> -R	ATCGATTTATGCGTCGCTTC	
<i>mdfA</i> -F	CATTGGCAGCGATCTCCTTT	54)
<i>mdfA</i> -R	TATAGTCACGACCGAGTTCTTTC	
<i>gapA</i> -F	GGCCAGGACATCGTTTCCAA	53)
<i>gapA</i> -R	TCGATGATGCCGAAGTTATCGTT	

2.5. 統計解析

2 群間における耐性獲得株について、カイ二乗検定を用いて統計解析を行った。

また、サンプル数が 5 以下の場合は、イエーツの連続性補正後に解析した。

第三節 結果

3.1. *In vitro* CMZ 曝露による耐性の獲得

被検菌株計 26 株はすべて CMZ に感受性を示し、 $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ 群 : 13 株、2-4 $\mu\text{g/mL}$ 群 : 13 株であった。ESBL 産生 *E. coli* 14 株の WT に対する CMZ の MIC は、 $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ 群 : 6 株、2-4 $\mu\text{g/mL}$ 群 : 8 株であった。一方、対照として選択した ESBL 非産生 *E. coli* 12 株は、MIC $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ 群 : 7 株、2-4 $\mu\text{g/mL}$ 群 : 5 株であった。

これら 26 株中 15 株 (57.7%) が、CMZ の 10 日間曝露後に耐性を獲得し (Fig. 1-A)、その内訳は MIC 2-4 $\mu\text{g/mL}$ 群が 10 株 (10/13 ; 76.9%)、MIC $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ 群が 5 株 (5/13 ; 38.4%) であり、MIC 2-4 $\mu\text{g/mL}$ 群における耐性化率は MIC $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ 群よりも有意に高かった ($P < 0.05$) (Fig. 1-A)。

Fig. 1-B に、ESBL 産生株における成績を示す。親株の MIC が 2-4 $\mu\text{g/mL}$ を示す群 (n=8) では、曝露 4 日目より耐性株が出現し始め、経時的に耐性株は増加した。一方、MIC $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ 群 (n=6) では、曝露 6 日目より耐性株が出現し始め、MIC 2-4 $\mu\text{g/mL}$ 群の場合と同様に耐性株が増加する推移を示したものの、10 日目には両群とも 60%を超える耐性獲得率であった。

他方、ESBL 非産生株の場合、MIC 2-4 $\mu\text{g/mL}$ 群 (n=5) では、曝露 5 日目より耐性株が出現し始めたが、MIC $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ 群 (n=7) では曝露 10 日目に 1 株が耐

性化したのみであった (Fig. 1-C)。

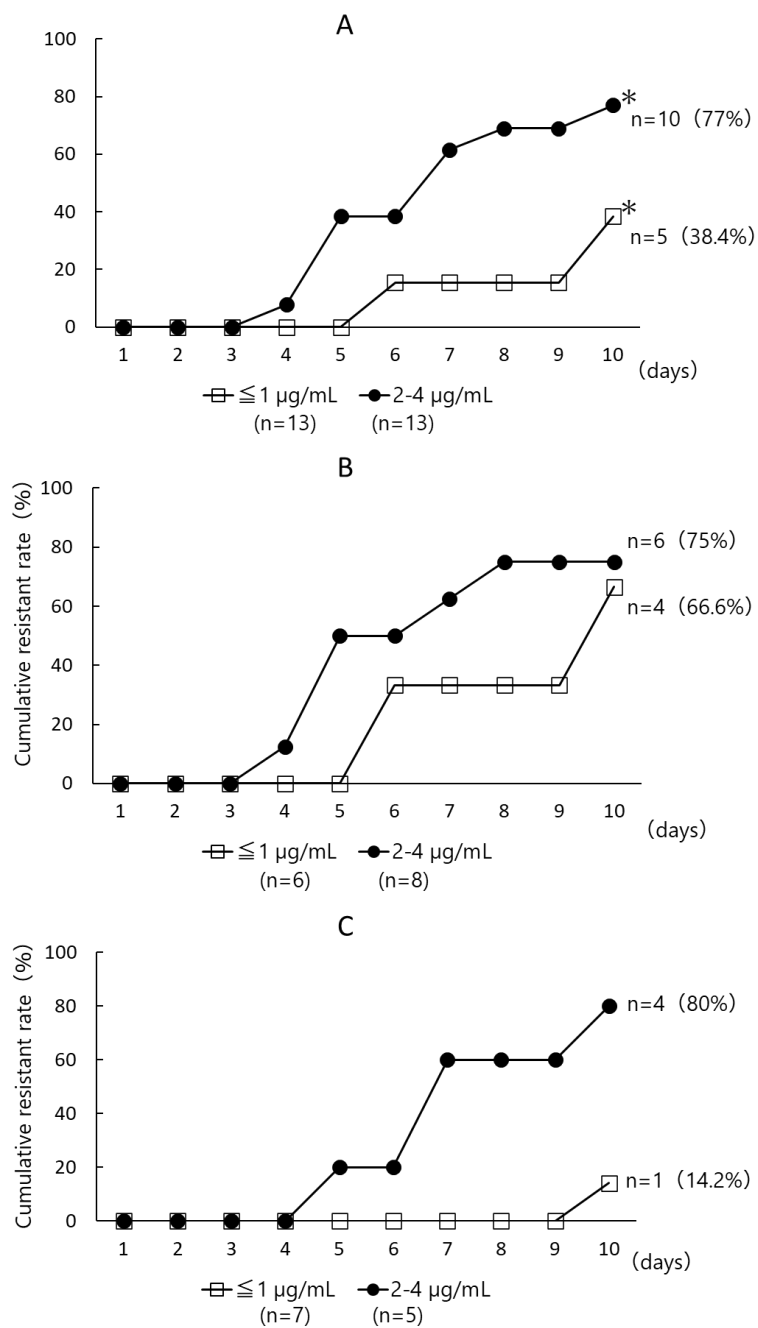


Figure 1 Resistance to *in vitro* cefmetazole exposure, by MIC group, in *E. coli* total (A), ESBL-producing *E. coli* (B), and non-ESBL *E. coli* (C). The data shows the cumulative resistance rate due to everyday cefmetazole exposure. *, $P < 0.05$

3.2. 抗菌薬フリー条件下および CMZ 再曝露による MIC の変化

計 26 株中 15 株が CMZ 10 日間曝露 (1st subculture) において耐性を獲得したが、抗菌薬フリー培地での 14 日間継代培養後に 11 株が感受性を回復した。残り 4 株 (EC-2,-5,-13,-20) は耐性が維持され、これらは全て ESBL 産生株であった (Table 5)。また、感受性が回復した 11 株は、再び CMZ 10 日間曝露 (2nd subculture) することにより、全て耐性を示した。

2 回目の CMZ 10 日間曝露により、ESBL 産生 *E. coli* では 14 株中 12 株 (85.7%)、非産生 *E. coli* では 12 株中 9 株 (75%) が耐性を示した。また、1 回目の CMZ 10 日間曝露後と比べて、2 回目の CMZ 10 日間曝露後では、26 株中 19 株 (73%) が 2-32 倍の MIC 上昇を認めた。一方、1 回目の CMZ 10 日間曝露後に耐性化しなかった 11 株は、2 回目の CMZ 曝露により 6 株 (54.5%) が新たに耐性を獲得した。

Table 5. MIC of cefmetazole against *Escherichia coli*

Strain number	MIC ($\mu\text{g/mL}$) of cefmetazole			
	Wild type	1 st subculture 10 days	Cefmetazole free for 14 days	2 nd subculture 10 days
<ESBL>				
EC-2	1	128	64	512
EC-3	1	4	2	128
EC-4	1	64	2	64
EC-5	1	64	64	256
EC-7	1	4	2	128
EC-8	1	64	16	128
EC-13	2	64	64	256
EC-14	2	64	8	256
EC-15	2	128	16	512
EC-16	2	8	2	32
EC-20	2	64	64	64
EC-21	4	32	2	32
EC-23	4	64	16	64
EC-25	4	256	16	256
<non-ESBL>				
EC-1	0.5	8	2	64
EC-6	1	4	4	32
EC-9	1	2	1	16
EC-10	1	4	1	4
EC-11	1	64	2	128
EC-12	1	4	0.5	64
EC-17	2	8	2	128
EC-18	2	64	16	128
EC-19	2	128	8	128
EC-22	4	64	16	128
EC-24	4	64	16	128
ATCC25922	1	32	4	128

EC, *Escherichia coli*

3.3. 各 AMR 関連遺伝子の mRNA 発現量の変化

1 回目の CMZ 10 日間曝露後に耐性 ($MIC \geq 64 \mu\text{g/mL}$) を獲得した 15 株では、WT に比してポーリン遺伝子である *ompF*、*ompC*、*phoE* の mRNA 発現量が、各々有意に低下した ($P < 0.05$) (Fig. 2)。一方、非耐性の 11 株でも、*phoE* の発現量は有意に低下がみられた ($P < 0.05$)。

ポーリンとは対照的に、薬剤排出ポンプをコードする *acrA*、*yhiV*、*mdfA* や染色体性 *ampC* の mRNA 発現量は、CMZ 曝露前後において変化がみられなかった (Fig. 3)。

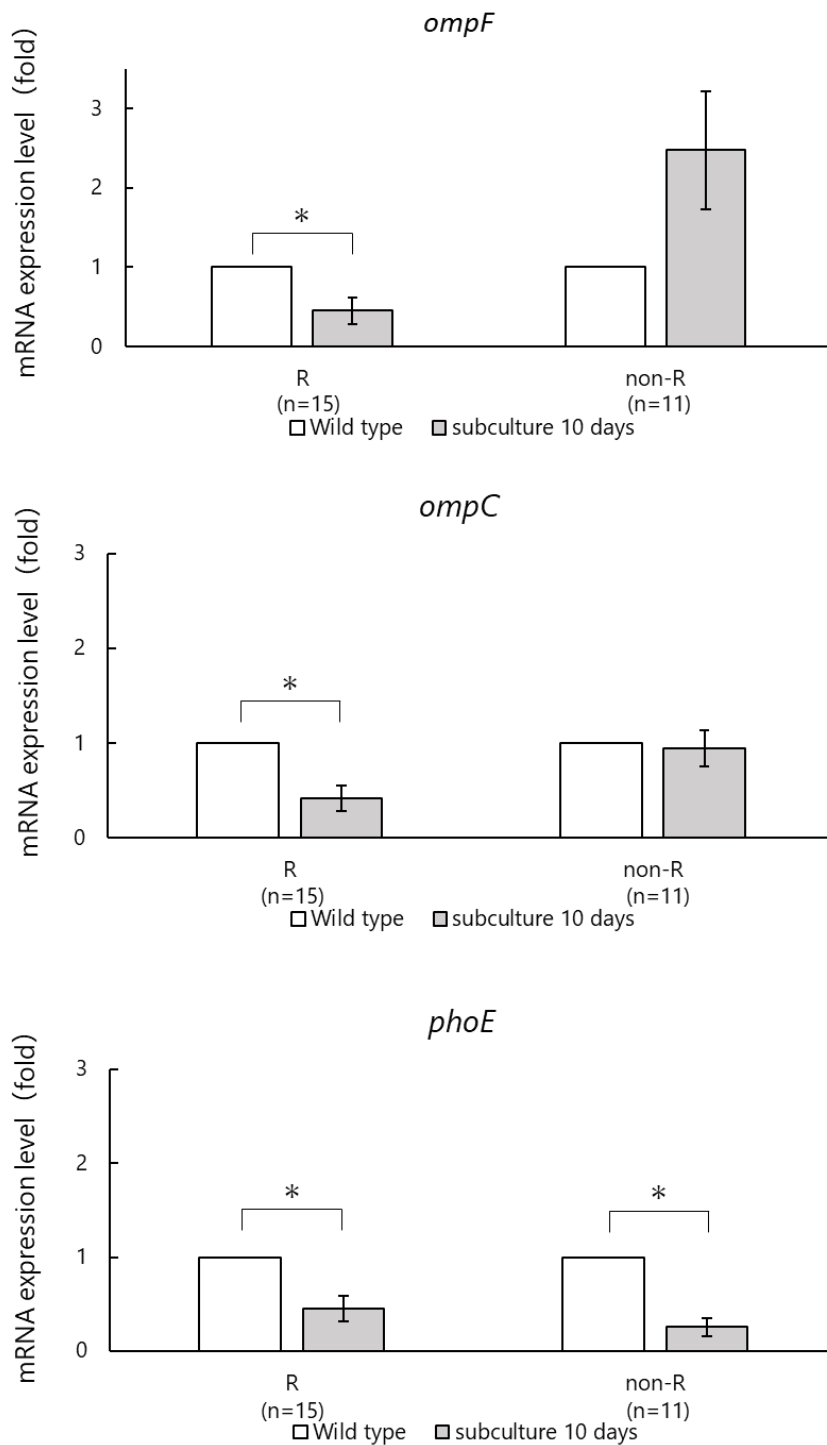


Figure 2 mRNA expression levels of *ompF*, *ompC*, and *phoE* in resistant and non-resistant strains after 10 days of cefmetazole exposure

R, cefmetazole resistant group; non-R, cefmetazole non-resistant group; *, $P < 0.05$

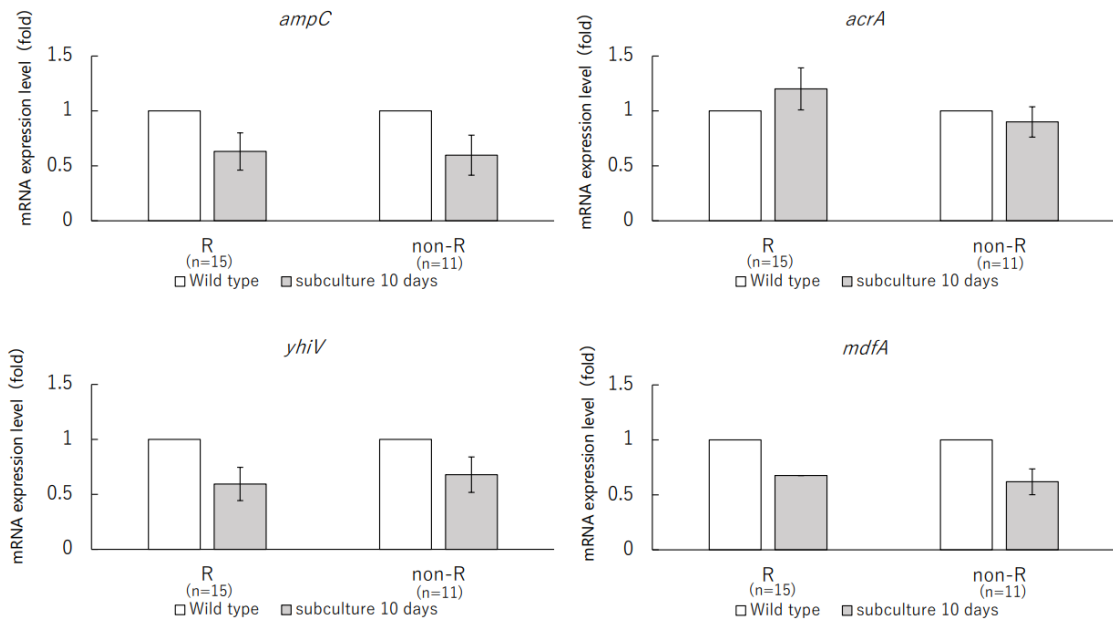


Figure 3 mRNA expression levels of chromosomal *ampC*, *acrA*, *yhiV* and *mdfA* genes

in this study cefmetazole 1st exposure assay

The expression levels of *c-ampC*, *acrA*, *yhiV* and *mdfA* were expressed with each wild type as 1.

R, cefmetazole resistant group; non-R, cefmetazole non-resistant group

第四節 考察

日本における ESBL 産生 *E. coli* に対する CMZ の MIC range は 0.5-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と報告されており⁵⁶⁾、本検討においても同様の結果であった。本検討では、CMZ 10 日間曝露 (1st subculture) によって 26 株中 15 株 (57.7%) が耐性化し、特に親株の MIC が 2-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示す *E. coli* は耐性を獲得しやすかった。今回さらに、CMZ 耐性獲得株を抗菌薬フリーの培地で 14 日間継代培養したところ、15 株中 11 株 (ESBL 産生株 6 株含む) が感受性を回復した。しかしながら、再び CMZ を 10 日間曝露 (2nd subculture) したところ 11 株すべてが高度耐性を示した。したがって、10 日程度の CMZ 投与により *E. coli* は耐性を獲得し、休薬によって一時的に感受性が回復するものの、再投与により高度耐性を示すようになることが明らかになった。この *in vitro* の成績は、臨床において CMZ を用いる場合、休薬後に再度使用すると高度耐性を示す可能性があることを示唆している。したがって、CMZ で臨床効果が望めない症例では、別の抗菌薬へ変更すべきであると考えられた。

今回、我々は CMZ に対する耐性獲得機序を解明するためポーリン、AmpC 型 β ラクタマーゼおよび薬剤排出ポンプの変動を調査した。一般に、*E. coli* に対する β ラクタム系薬の耐性⁵⁷⁾は、 β ラクタマーゼの過剰発現やポーリンの発現低下などによって引き起こされる。グラム陰性菌の外膜にはポーリンと呼ばれる

タンパク質が存在しており、これは必要な栄養素のみならず抗菌薬の菌体内への流入経路として機能し、グラム陰性菌における薬剤耐性獲得にも関与している^{58,59)}。*K. pneumoniae* では、ポーリンの減少または喪失が、薬剤感受性を変化させる⁶⁰⁾。*E. coli* では特に OmpF と OmpC、PhoE が主要なポーリンとして知られており、OmpF はβラクタム系薬やキノロン系薬など多くの抗菌薬の外膜透過経路である⁶¹⁾。また、OmpC は陽イオン、PhoE は陰イオンや無機リン酸塩等に親和性を有している。しかしながら、各ポーリン孔の口径は、OmpF が 1.2 nm⁵⁸⁾、OmpC と PhoE は 1.0 nm^{62,63)}とほぼ同等であり、いずれもβラクタム系薬の菌体内への取り込みに関与しているとの報告もある⁶⁴⁾。今回、CMZ 曝露によって耐性を獲得した *E. coli* では、*ompF*、*ompC*、*phoE* の mRNA 発現量が低下していた (Fig. 2)。このうち *phoE* は非耐性群においても mRNA 発現量は有意に減少していたが、両群においてその発現量の低下は同程度であった。したがって、*phoE* の減少は CMZ 耐性獲得にほとんど寄与していないと考えられた。すなわち、CMZ 耐性獲得群では、*ompF* と *ompC* の発現が低下していたことから、これが CMZ 耐性と強く関連していることが示唆された。

このほか一般に、βラクタム系薬の耐性機序のひとつとして、AmpC 型 βラクタマーゼの関与も知られている⁵⁰⁾。セファマイシン系薬は通常 ESBL に対して安定であるが、AmpC 型 βラクタマーゼによって分解される特徴を有する⁶⁵⁾。

腸内細菌目細菌では、その産生に関わる遺伝子を染色体上に保有しており⁶⁶⁾、*E. coli* は AmpC の発現調節因子である AmpR が欠如しているため^{67,68)}、常に AmpC を産生しやすい菌である。しかしながら、本検討では CMZ 曝露によって、染色体性 *ampC* の mRNA 発現量は、曝露前後において変化していなかった。そのため、CMZ 曝露による *E. coli* の耐性獲得として、AmpC 型 β ラクタマーゼの関与は低いと考えられた。

同様に、耐性獲得機序として排出ポンプの影響⁶⁹⁾も考えられた。*E. coli* の主要な排出ポンプは AcrAB-TolC、YhiV および MdfA である。セファマイシン系薬の耐性獲得に、薬剤排出ポンプをコードする遺伝子の高発現⁷⁰⁾の関与が示唆されているが、本検討では CMZ 耐性株における排出ポンプの発現量は各親株と比較してその変化はみられず、耐性獲得との関連はないと判断された。以上より、*E. coli* に対する CMZ 耐性は、ポーリン OmpF と OmpC をコードする遺伝子の発現低下がそのメカニズムであると考えられた。

第三章

ESBL 産生株を含む *Escherichia coli* における

cefmetazole 耐性化抑制について

第一節 緒言

薬剤耐性菌に対する抗菌化学療法は、世界レベルの重要な課題であるにもかかわらず、新規抗菌薬の開発は困難な状況にある。耐性菌感染症における抗菌薬の選択肢は非常に乏しく、治療に難渋することが多い。このような AMR を考慮した抗菌化学療法は、耐性メカニズムを阻害する薬剤との配合剤を用いることが主流になりつつある。例えば、 β ラクタマーゼ阻害剤である tazobactam や sulbactam を配合した tazobactam/piperacillin や sulbactam/ampicillin が広く臨床で使用されている。また *Escherichia coli* の感染部位で産生される活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) により遺伝子変異が誘発されることで、薬剤感受性が低下することも明らかとなっており⁷¹⁻⁷⁴⁾、抗 ROS 薬の耐性化抑制作用が期待されている。実際、ROS の産生を抑制する作用のある DHL-His-Zn は、*P. aeruginosa* の薬剤耐性化を阻止する可能性のある薬剤として報告されている⁷⁵⁾。このように、既存の薬剤を組み合わせることにより、耐性化を抑制できる可能性がある。

第二章において我々は、ESBL 産生株を含む *E. coli* のうち 57.7% (26 株中 15 株) が、cefmetazole に耐性を獲得することを示した。これらの耐性獲得株は、菌体内に抗菌薬が流入する透過孔 (ポーリン) をコードする *ompF* と *ompC* の発現量が低下していた。ESBL 産生株を含む *E. coli* における cefmetazole 耐性獲得のメカニズムとしてポーリンの発現量減少が示唆されたことから、ポーリンの発現を上昇させる薬剤と組み合わせることで cefmetazole 耐性化を抑制できる可能性がある。したがって、第三章ではポーリンの発現低下を阻止し、cefmetazole 耐性化を抑制する薬剤を探索した。

第二節 実験材料および方法

2.1. 被検菌株と使用薬剤

被検菌株は、第二章の耐性獲得実験において、cefmetazole 曝露 5 日後の耐性獲得群 5 株 (ESBL 産生株 3 株、非産生株 2 株) および非耐性群 5 株 (ESBL 産生株 2 株、非産生株 3 株) の計 10 株を選択した。これらの選択基準は Wild Type (WT) の MIC がそれぞれ異なる株とした。

抗菌薬は、cefmetazole (CMZ: Sigma-Aldrich Co., LLC, Tokyo) を使用した。さらに、今回はポーリンの発現に作用する物質として、安息香酸ナトリウム (WAKO, Osaka)⁷⁶⁾、サリチル酸ナトリウム (WAKO)⁷⁷⁾ および relebactam (REL: Med Chem Express, NJ)^{78,79)} を用いた。

2.2. CMZ 耐性化抑制物質のスクリーニング

CMZ の希釈系列 (2 MIC-1/4 MIC) を 96-well マイクロプレートに作成した。この希釈系列に、最終濃度が安息香酸ナトリウム: 5 mM (720.5 µg/mL)、サリチル酸ナトリウム: 10 mM (1601 µg/mL) および REL: 16 µg/mL となるようにそれぞれ添加した⁷⁶⁻⁷⁹⁾。

被検菌株 10 株を MHA で 37°C、24 hr 培養後、PBS を用いて McFarland no. 0.5 (1.5×10^8 CFU/mL) に調整した。この菌液は MHB を用いて 300 倍に希釈後、

上記で作成した 96-well マイクロプレートに接種し 37°C、16-20 hr で培養した。CMZ の 1/2 MIC における生残株を集菌し、新たに作成したマイクロプレートの希釈系列に接種した。この操作を 10 回（10 日間）繰り返し、その都度 MIC の変化を確認した。また、対照として被検菌株 10 株を CMZ 単剤で作成した希釈系列に 10 日間曝露させ、MIC の推移を確認した。

なお、感受性判定は CLSI に準拠し²⁰⁾、CMZ の MIC : $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ を耐性とした。

2.3. REL 至適濃度の探索とポーリン遺伝子の発現量解析

2.2.と同様のプロトコールを用いて、REL の濃度別に検討を行った。REL 250 mg 点滴静脈内投与時の最高血中濃度 (C_{max}) が $15.0 \mu\text{g/mL}$ ⁷⁹⁾であることを参考に、REL 添加濃度は $16 \mu\text{g/mL}$ 、 $8 \mu\text{g/mL}$ および $4 \mu\text{g/mL}$ に設定し、REL の至適濃度を検討した。REL 添加 CMZ 曝露モデル 5 日後および CMZ 単剤曝露 10 日後の各 1/2 MIC 生残株に対して、ポーリン遺伝子である *ompF*、*ompC* および *phoE* の mRNA 発現量を real-time RT-PCR 法で測定した。各菌株における total RNA の抽出は、TRI REAGENTTM LS (Molecular Research Center, Inc. OH) を用いたフェノール抽出法で実施した。RNA 濃度を BioSpec-nano (Shimadzu Corporation, Kyoto) で確認後、iTaq Universal SYBR Green One-Step Kit (Bio-Rad, Hercules, CA) を添

付指示書に従って調整した。解析装置は CFX Connect™ Real-time System (Bio-Rad) を使用し、これらの実験を 2 回繰り返した。各々の遺伝子に対する Primer は、*ompF*-Fw (5'-AAGTAGTAGGTTGCGCCCAC-3')、*ompF*-Rv (5'-AGTTCGAT TTCGGTCTGCGT-3')、*ompC*-Fw (5'-ATTCTGGCAGTACGTCGGTC-3')、*ompC*-Rv (5'-AAACAACCTCCTGGACCCGTG-3')、*phoE*-Fw (5'-CAGGCTTCCACGTC ATACAA-3')、*phoE*-Rv (5'-TTATGGTCGTTGGGAAGCTG-3') を用いた⁵²⁾。各遺伝子の mRNA 発現量は、内在性コントロールとして *gapA* の合成プライマー (*gapA*-Fw : 5'-GGCCAGGACATCGTTTCCAA-3'、*gapA*-Rv : 5'-TCGATGATG CCGAAGTTATCGTT-3') を用いて補正し⁵³⁾、検量線法で算出した。WT の mRNA 発現量を 1 とし、本検討では各遺伝子の発現量が 2 倍以上を発現亢進、0.5 倍以下を発現低下と定義した⁵⁵⁾。

第三節 結果

3.1. CMZ の耐性化を抑制するポーリン作用薬

CMZ 単剤曝露時では、曝露 4 日目から耐性株が検出され、10 日目には 10 株中 5 株 (50%) が耐性を示した (Fig. 4)。安息香酸ナトリウムを添加した場合、曝露 7 日目までは 10 株中 3 株 (30%) のみの耐性化に抑えられていたが、9 日目にはすべての株が耐性を獲得した。一方、サリチル酸ナトリウム添加時では、曝露 3 日目より 10 株中 6 株 (60%) が耐性を獲得し、5 日目にはすべての株が耐性化した。しかしながら、REL 添加時では、すべての株で耐性化が抑制された。

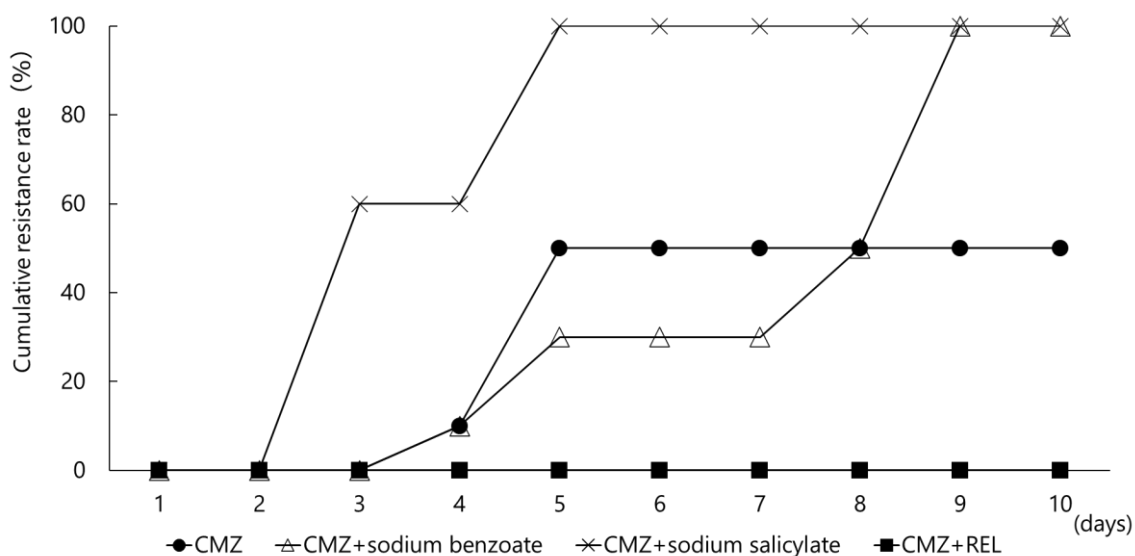


Figure 4 Change of MIC by *in vitro* cefmetazole exposure at the time of addition of each sodium benzoate, sodium salicylate or relebactam

CMZ, cefmetazole; REL, relebactam

3.2. REL の濃度別における CMZ の感受性変化

REL の CMZ 耐性化抑制効果は、濃度依存的であることが確認された。CMZ 単剤曝露によって 5 日目に耐性を獲得した 5 株 (EC-5, -14, -25, -19, -22) は、REL 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加した場合、耐性化がすべて抑制された (Fig. 5)。一方、REL 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 5 日目に 1 株が耐性となり、8 日目までは耐性株の増加はみられなかったが、9 日目には 5 株中 2 株 (40%) が耐性を獲得した。しかしながら、REL 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 5 日目より耐性株 (5 株中 2 株) がみられ、10 日目には 5 株中 4 株 (80%) が耐性を示した。

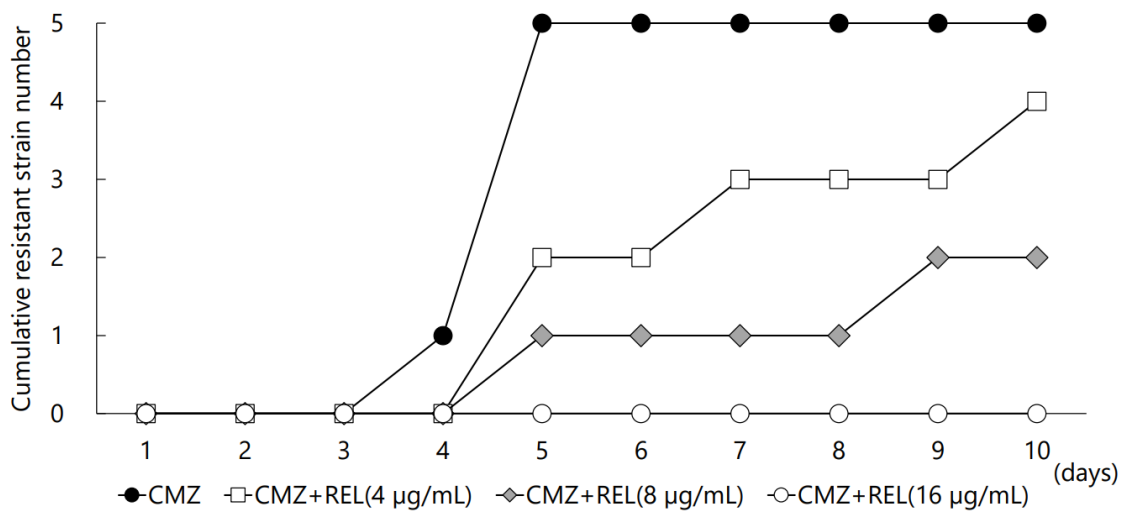


Figure 5 Resistance to *in vitro* cefmetazole exposure at the time of addition of relebactam

CMZ, cefmetazole; REL, relebactam

3.3. *In vitro* REL 添加 CMZ 曝露モデルにおけるポーリンの発現量

REL 添加 CMZ 曝露および CMZ 単剤曝露における各種ポーリンの mRNA 発現量を Table 6 に示した。CMZ 単剤曝露により耐性化した 5 株 (EC-5, -14, -25, -19, -22) のうち、CMZ の MIC が 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上を示した 2 株 (EC-25, -19) において、*ompF* の発現が基準となる 0.5 倍以下に低下した。REL 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の添加により、これらの株は耐性化が抑制されたが、特に *ompF* の発現が 2.1-4.37 倍に上昇した。しかしながら、*ompC* と *phoE* は多くの株で 2 倍以上の上昇を示さなかった。一方、非耐性群では *ompF*、*ompC* の各 mRNA の発現量は WT と概ね同等であったが、REL 添加後に *ompF* が 5 株中 3 株で 2 倍以上の発現を示した。

Table 6. Changes in *ompF*, *ompC* and *phoE* mRNA expression in combination with relebactam and cefmetazole

Strain number	ESBL produce	Wild Type	CMZ subculture 10 days			CMZ with REL (16 µg/mL) subculture 5 days				
		MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	mRNA expression level (fold)			MIC (µg/mL)	mRNA expression level (fold)		
				<i>ompF</i>	<i>ompC</i>	<i>phoE</i>		<i>ompF</i>	<i>ompC</i>	<i>phoE</i>
<CMZ resistance group>										
EC-5	+	1	64	0.78	0.49	0.37	4	3.2	8	1.8
EC-14	+	2	64	0.11	0.23	0.31	2	2.1	1.52	0.3
EC-25	+	4	256	0.2	0.12	0.49	4	3.3	2.7	1.9
EC-19	-	2	128	0.08	0.2	0.007	2	4.37	1.6	5.9
EC-22	-	4	64	0.6	0.9	0.6	4	3.46	0.65	0.2
<CMZ non-resistance group>										
EC-1	-	0.5	8	1	0.2	0.1	4	1.7	0.8	0.2
EC-10	-	1	4	1.7	0.8	0.2	4	5.2	1.5	1
EC-17	-	2	8	7.5	0.7	0.4	2	2.7	1.36	0.3
EC-7	+	1	4	2.17	0.01	0.54	8	1.4	1.6	0.2
EC-21	+	4	32	1.1	1.19	0.05	4	2.3	1.1	0.2

The expression levels of *ompF*, *ompC*, and *phoE* were expressed with each wild type as 1.

EC, *Escherichia coli*

第四節 考察

E. coli における OmpF や OmpC などのポーリンは、菌体外膜に豊富に分布しており、栄養の取り込みや代謝などに関与している。ポーリンは *E. coli* などのグラム陰性菌において生存に不可欠な機能であるが、抗菌薬などが外部環境から細菌細胞内に流入する主要な経路でもある。第二章において、*E. coli* に対する CMZ の耐性機序がポーリン (OmpF および OmpC) の発現低下であることが示唆された。したがって、本章ではポーリン発現抑制株に対する新しい配合剤の候補となる安息香酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウムおよび REL を用いて検討した。

安息香酸ナトリウムは酸型保存料として知られており、防腐剤に用いられている。食品保存料である安息香酸ナトリウムは、細菌の増殖を抑制することで、食品の腐敗や変性を防いでいる。その作用機序は、細菌細胞における増殖に関する代謝を阻害することで抗菌作用を示す^{80,81)}。すなわち、細菌の代謝に必要な異化と同化において、グルコースや電解質を取り込むポーリンに影響を与えると考えられた。したがって、安息香酸ナトリウムの曝露により徐々に CMZ が流入するポーリンの発現が減少し、耐性を獲得したと考えられる。以上より、安息香酸ナトリウム添加 CMZ 曝露モデルの初期では CMZ の抗菌効果が保持されるものの、時間の経過とともにポーリンの発現低下 (*ompF*、0.3-0.67 倍) がみられ、

CMZ 耐性化を助長したと推察された。

次に、鎮痛剤として使用されているサリチル酸ナトリウムの曝露モデルでは、曝露 3 日目の早期に高度耐性 ($MIC \geq 256 \mu\text{g/mL}$) を示し、5 日目にすべての株が耐性を獲得した。サリチル酸ナトリウムはポーリンに作用するものの⁸²⁾、実際には *ompF* の発現量は 0.1-0.4 倍に低下し、むしろ CMZ の耐性化を助長した。*E. coli* 感染症の治療において、解熱剤として用いられるサリチル酸ナトリウムの服用にあたっては、CMZ の併用は注意する必要があるかもしれない。

REL は、ESBL や AmpC などの β ラクタマーゼを阻害する β ラクタマーゼ阻害剤であり⁸³⁾、それ自体に抗菌活性は認められていない⁸⁴⁾。一方、*in vitro* においてカルバペネム系薬に耐性を示すポーリン欠損の *K. pneumoniae* および *P. aeruginosa* に対し、REL を併用することでカルバペネム系薬の感受性が回復することが明らかになっている^{78,85,86)}。今回、REL 16 $\mu\text{g/mL}$ を添加したところ、すべての株で耐性化が抑制された。REL の添加は、CMZ 単剤曝露による耐性獲得群 5 株において *ompF* の発現量が 2.1-4.3 倍に上昇しており、我々は本検討で REL の *ompF* に対する作用を初めて見出した。臨床で使用されている REL は一回量に 250 mg 含まれており、血漿中の C_{max} は 15 $\mu\text{g/mL}$ を示す⁷⁹⁾。REL との合剤として臨床で使用されている imipenem では、最大殺菌作用を得るために Time above MIC (TAM) が 50%を超える必要があり、REL も同様に 50%到達を目指す

場合、4 µg/mL 以上が必須となる。REL 濃度別の検討において、REL が 16 µg/mL で添加された場合は耐性獲得株はみられなかったが、REL 4 µg/mL では 80% (4/5 株) が、REL 8 µg/mL でも 40% (2/5 株) が CMZ 耐性を獲得している。しかしながら、これら 3 濃度の REL 添加 CMZ 曝露は、いずれも 4 日目まで耐性を抑止できていた。REL の高濃度曝露により耐性化を抑制できる可能性は高いが、毒性や副作用の安全面から REL 4 µg/mL が至適用量と考えられている。したがって、*E. coli* の CMZ 耐性化抑制に対する現行の REL (4 µg/mL) の投与は、長期使用で耐性株が出現するため注意が必要と考えられた。

REL 以外の β ラクタマーゼ阻害剤として臨床使用されている薬剤に tazobactam と sulbactam がある。*P. aeruginosa* に対する sulbactam/ampicillin の MIC 分布は MIC₅₀ : 400 µg/mL、MIC₉₀ : >400 µg/mL であり⁸⁷⁾、抗菌力は非常に劣っている。また、同株に対する tazobactam/piperacillin の抗菌力も低下しており⁸⁸⁾、REL 以外の β ラクタマーゼ阻害薬はポーリンに対する効果が期待できないと考えられた。ポーリンを活性化する薬剤の候補として、本検討で見出した REL が最も有力であり、その併用はポーリンの発現亢進によって CMZ の耐性化を抑止できる可能性が示唆された。

総 括

腸内細菌目細菌における ESBL 産生株による感染症が世界的に問題となっており、その大半を *E. coli* が占めている。ESBL 産生 *E. coli* 感染症に対する抗菌薬は、重症例に対するカルバペネム系薬、軽・中等症例においては CMZ などがあるが、臨床で選択できる抗菌薬は極めて少ない。わが国では安価かつ抗菌活性を有する CMZ が広く臨床で使用されており、偏った使用による耐性化が懸念されるが、ESBL 産生 *E. coli* に対する CMZ の耐性獲得に関する検討は乏しい。そこで、本研究では CMZ の耐性獲得機序及びその耐性獲得阻止に関する検討を行った。

第一章では宮城県内における ESBL 産生株の蔓延状況を把握するため、*E. coli* の臨床分離株を対象に ESBL 産生株のスクリーニングを行い、関連遺伝子の解析を実施した。臨床分離株された *E. coli* 62 株のうち ESBL 産生株は 22.6% (14 株) を占め、わが国における成績 (2015 年、24.3%) と同様の結果であったことから、全国と同程度に広く拡散しているものと考えられた。また、これらの遺伝子解析において、TEM 型と CTX-M 型を併せ持つ菌株が 14 株中 5 株 (35.7%) みられた。耐性遺伝子を複数保有する株は重症例で検出されやすい。このような株は東北地方では初めて確認されたため、拡散防止に努めると

ともに継続的な調査が必要であると考えられた。

第二章では、*in vitro* CMZ 曝露モデルを作成し、*E. coli* に対する CMZ 耐性獲得機序について検討を行った。CMZ 10 日間曝露によって 26 株中 15 株

(57.7%) が耐性を示した。これらの耐性獲得株を抗菌薬フリー培地で 14 日間継代培養することで、15 株中 11 株が感受性に回復したが、再曝露により 11 株

すべてが高度耐性を示した。このことから、CMZ 投与により *E. coli* の半数以

上が耐性を獲得し、耐性株の多くは休薬により感受性を回復するが、再曝露に

よって高度耐性に至り、治療が困難となることが示唆された。さらに、CMZ に

対する耐性獲得メカニズムを解明すべく、耐性獲得株におけるポーリン、

AmpC 型 β ラクタマーゼおよび薬剤排出ポンプをコードする遺伝子の各 mRNA

発現量を確認した。耐性獲得株では、ポーリン遺伝子をコードする *ompF* と

ompC の発現が低下していたことから、これが CMZ 耐性と強く関連していると

示唆された。一方、AmpC 型 β ラクタマーゼおよび薬剤排出ポンプをコードす

る遺伝子の mRNA 発現量は、CMZ 曝露前後において変化が乏しく、耐性獲得

への関与は低いと考えられた。

第三章では、第二章で示唆されたポーリン発現低下による耐性獲得を抑制する薬剤について検討を行った。その候補としてポーリンへの作用が期待される

安息香酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウムおよび REL を選択し、CMZ 曝露

モデルへの添加による MIC の変化およびポーリンの発現量を解析した。このうち REL 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加した場合のみ、すべての株で耐性化が抑制された。また、CMZ 単剤曝露における耐性獲得株は、REL 添加 CMZ 曝露では全ての株において感受性を保持し、特に *ompF* の mRNA 発現量が高発現していたことから、REL の *ompF* に対する作用が本検討によって初めて示された。

わが国における CMZ の使用機会は近年増加しているが、*E. coli* に対する CMZ は 10 日以内の曝露で耐性を獲得することを本研究で示した。容易に耐性を獲得しない新規抗菌薬の開発が急務であるが、収益性や新規ターゲットの枯渇等の理由から新薬開発は困難であるため、既存薬を組み合わせた併用療法が必要である。今回、*E. coli* に対する CMZ 耐性化の抑制を考慮した配合剤として、ポーリン発現を亢進させる REL の有効性が明らかになった。今後は、適切な投与計画の評価とともに臨床応用に向けた検討が必要である。

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻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。

本論文を御精読いただき、有益なる御助言賜りました、東北医科薬科大学大学院薬学研究科 病態解析学教室 教授 大河原 雄一 先生、天然物化学教室 教授 内田 龍児 先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、種々の御助言、御指導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 助教 河村 真人 先生、助教 佐藤 匠 先生に感謝致します。

本研究に対し、終始御支援賜りました東北医科薬科大学 理事長・学長 高柳 元明 博士に深謝申し上げます。

最後に、本研究を行うにあたり、終始激励ならびに支援を賜りました同僚、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) Zhu YG, Zhao Y, Li B, Huang CL, Zhang SY, Yu S, Chen YS, Zhang T, Gillings MR, Su JQ. Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes. *Nat Microbiol.* **30**:16270. (2017)
- 2) Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
[Accessed 20 September 2022]
- 3) Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, Colomb-Cotinat M, Kretzschmar ME, Devleeschauwer B, Cecchini M, Ouakrim DA, Oliveira TC, Struelens MJ, Suetens C, Monnet DL. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European economic area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis.* **19**: 56-66. (2019)
- 4) Tickell S. The antibiotic innovation study: expert voices on a critical need. ReAct action on antibiotic resistance, 2012. <http://www.reactgroup.org> [Accessed 18 September 2022]
- 5) Jean SS, Harnod D, Hsueh PR. Global threat of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *Front Cell Infect Microbiol.* **12**: 823684. (2022)

- 6) 厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業（検査部門）．病床数別公開情報 2018 年. <https://janis.mhlw.go.jp/report/kensa.html>
- 7) Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf> [Accessed 20 September 2022]
- 8) Critchley IA, Cotroneo N, Pucci MJ, Jain A, Mendes RE. Resistance among urinary tract pathogens collected in Europe during 2018. *J Glob Antimicrob Resist.* **23**: 439-444. (2020)
- 9) Kobayashi K, Yamamoto S, Takahashi S, Ishikawa K, Yasuda M, Wada K, Hamasuna R, Hayami H, Minamitani S, Matsumoto T, Kiyota H, Tateda K, Sato J, Hanaki H, Masumori N, Hiyama Y, Yamada H, Egawa S, Kimura T, Nishiyama H, Miyazaki J, Matsumoto K, Homma Y, Kamei J, Fujimoto K, Torimoto K, Tanaka K, Togo Y, Uehara S, Matsubara A, Shoji K, Goto H, Komeda H, Ito T, Mori K, Mita K, Kato M, Fujimoto Y, Masue T, Inatomi H, Takahashi Y, Ishihara S, Nishimura K, Mitsumori K, Ito N, Kanamaru S, Yamada D, Hiroshi M, Yamashita M, Tsugawa M, Takenaka T, Takahashi K, Oka Y, Yasufuku T, Watanabe S, Chihara Y, Okumura K, Kawanishi H, Matsukawa M, Shigeta M, Koda S. The third national Japanese antimicrobial susceptibility pattern surveillance program: Bacterial isolates from

- complicated urinary tract infection patients. *J Infect Chemother.* **26**: 418-428. (2020)
- 10) Chong Y, Shimoda S, Yakushiji H. Community spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*: a long-term study in Japan. *J Med Microbiol.* **62**: 1038-1043. (2013)
- 11) Doi Y, Park YS, Rivera JI. Community-associated extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* infection in the United States. *Clin Infect Dis.* **56**: 641-648. (2013)
- 12) Vardakas KZ, Tansarli GS, Rafailidis PI, Falagas ME. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* **67**: 2793-2803. (2012)
- 13) 青木 信樹, 荒川 創一, 尾内 一信, 大西 健児, 金子 明寛, 清田 浩, 舘田 一博, 保富 宗城, 松下 和彦, 三笠 桂一, 三鴨 廣繁, 望月 清文, 渡辺 晋一. JAID/JSC 感染症治療ガイド 2019. 日本感染症学会・日本化学療法学会. (2019)
- 14) McLaughlin M, Advincula MR, Malczynski M, Qi C, Bolon M, Scheetz MH. Correlations of antibiotic use and carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **57**: 5131-5133. (2013)

- 15) 石井 良和. 抗菌薬耐性グラム陰性菌の生き残り戦略と感染症治療薬の開発.
環境感染誌. **34**: 282-286. (2019)
- 16) Chong Y, Shimoda S, Shimono N. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Genet Evol.* **61**: 185-188. (2018)
- 17) Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**: 1211-1233. (1995)
- 18) Toner L, Papa N, Aliyu SH, Dev H, Lawrentschuk N, Al-Hayek S. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in hospital urinary tract infections: incidence and antibiotic susceptibility profile over 9 years. *World J Urol.* **34**: 1031-1037. (2016)
- 19) Benz F, Huisman JS, Bakkeren E, Herter JA, Stadler T, Ackermann M, Diard M, Egli A, Hall AR, Hardt WD, Bonhoeffer S. Plasmid- and strain-specific factors drive variation in ESBL-plasmid spread *in vitro* and *in vivo*. *ISME J.* **15**: 862-878. (2021)
- 20) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S31 edition. Wayne, PA: CLSI; 2021.
- 21) AMED Public and Private Partnerships for Infectious Diseases R&D. Priority

pathogens lists for R&D of new antibiotics, 2021. <https://id3catalyst.jp/apid/list.html>

[Accessed 20 September 2022]

- 22) Rupp ME, Fey PD. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs*. **63**: 353-365. (2003)
- 23) Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health*. **17**: 6278. (2020)
- 24) Paitan Y. Current trends in antimicrobial resistance of *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol*. **416**: 181-211. (2018)
- 25) Doi Y, Iovleva A, Bonomo RA. The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world. *J Travel Med*. **24**: S44-S51. (2017)
- 26) D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol*. **303**: 305-317. (2013)
- 27) Clermont O, Lavollay M, Vimont S, Deschamps C, Forestier C, Branger C, Denamur E, Arlet G. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother*. **61**: 1024-1028. (2008)

- 28) Liao K, Chen Y, Wang M, Guo P, Yang Q, Ni Y, Yu Y, Hu B, Sun Z, Huang W, Wang Y, Wu A, Feng X, Luo Y, Hu Z, Chu Y, Chen S, Cao B, Su J, Gui B, Duan Q, Zhang S, Shao H, Kong H, Xu Y. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* causing intra-abdominal infections from 9 tertiary hospitals in China. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **87**: 45-48. (2017)
- 29) Masui T, Nakano R, Nakano A, Saito K, Suzuki Y, Kakuta N, Horiuchi S, Tsubaki K, Kitahara T, Yano H. Predominance of CTX-M-9 Group Among ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolated from Healthy Individuals in Japan. *Microb Drug Resist.* **28**: 355-360. (2022)
- 30) 吉川 晃司, 森武 潤, 鈴木 鑑, 吉良 慎一郎, 小出 晴久, 清田 浩, 堀 誠治. 尿路由来基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌の検出状況および薬剤感受性の検討. *日化療会誌.* **62**: 198-203. (2014)
- 31) Muratani T, Matsumoto T. Urinary tract infection caused by fluoroquinolone- and cephem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents.* **28**: S10-13. (2006)
- 32) Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* **14**: 144-153. (2008)

- 33) Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* **8**: 159-166. (2008)
- 34) Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev.* **27**: 543-574. (2014)
- 35) 岸 亮子, 熱田 純子, 穂葉 優子, 勝部 和徳, 黒崎 守人, 福島 博. 島根県の医療機関で分離された基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌の遺伝子型別. 島根保環研所報. **50**: 66-69. (2008)
- 36) 除村 萌, 蓮沼 裕也, 石松 尚, 角田 拓也, 徳岡 由一. 神奈川県内中小規模医療施設から分離された CTX-M 型 β -lactamase 産生 *Escherichia coli* の疫学調査. 日臨微生物誌. **29**: 21-27. (2019)
- 37) Ahamed Riyaz AA, Perera V, Sivakumaran S, de Silva N. Typhoid fever due to extended spectrum β -lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Typhi: A case report and literature review. *Case Rep Infect Dis.* **2018**: 4610246. (2018)
- 38) 本間 操, 柴田 尚宏, 鈴木 智一, 荒川 宜親. 骨髄移植後患者で経験した SHV-12 型と CTX-M-14 型 ESBL 産生 *Enterobacter cloacae* による敗血症の 1 例. 感染症誌. **81**: 745-750. (2007)
- 39) Chong Y, Shimoda S, Shimono N. Current epidemiology, genetic evolution and

- clinical impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Genet Evol.* **61**: 185-188. (2018)
- 40) Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect.* **73**: 345-354. (2009)
- 41) de Kraker ME, Wolkewitz M, Davey PG, Koller W, Berger J, Nagler J, Ickert C, Kalenic S, Horvatic J, Seifert H, Kaasch A, Paniara O, Argyropoulou A, Bompola M, Smyth E, Skally M, Raglio A, Dumpis U, Melbarde Kelmere A, Borg M, Xuereb D, Ghita MC, Noble M, Kolman J, Grabljevec S, Turner D, Lansbury L, Grundmann H. Burden of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay associated with bloodstream infections due to *Escherichia coli* resistant to third-generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother.* **66**: 398-407. (2011)
- 42) Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ. Infectious diseases society of America guidance on the treatment of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacterales* (ESBL-E), carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with difficult-to-treat resistance (DTR-*P. aeruginosa*). *Clin Infect Dis.* **72**: e169-e183. (2021)
- 43) Tamma PD, Han JH, Rock C, Harris AD, Lautenbach E, Hsu AJ, Avdic E, Cosgrove

- SE; Antibacterial resistance leadership group. Carbapenem therapy is associated with improved survival compared with piperacillin-tazobactam for patients with extended-spectrum β -lactamase bacteremia. *Clin Infect Dis.* **60**: 1319-1325. (2015)
- 44) Harris PN: Clinical management of infections caused by *Enterobacteriaceae* that express extended-spectrum β -lactamase and AmpC enzymes. *Semin Respir Crit Care Med.* **36**: 56-73. (2015)
- 45) Karaiskos I, Giamarellou H. Carbapenem-sparing strategies for ESBL producers: When and how. *Antibiotics.* **9**: 61. (2020)
- 46) Bandy A, Tantry B. ESBL activity, MDR, and Carbapenem resistance among predominant *Enterobacterales* isolated in 2019. *Antibiotics.* **10**: 744. (2021)
- 47) Araki K, Fukuoka K, Higuchi H, Aizawa Y, Horikoshi Y. Cefmetazole for extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in pediatric pyelonephritis. *Pediatr Int.* **61**: 572-577. (2019)
- 48) Doi A, Shimada T, Harada S, Iwata K, Kamiya T. The efficacy of cefmetazole against pyelonephritis caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Int J Infect Dis.* **17**: e159-163. (2013)
- 49) Tamma PD, Rodriguez-Bano J. The use of noncarbapenem β -lactams for the treatment of extended-spectrum β -lactamase infections. *Clin Infect Dis.* **64**: 972-

980. (2017)

50) Rodríguez-Baño J, Gutiérrez-Gutiérrez B, Machuca I, Pascual A. Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, AmpC-, and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev.* **31**: e00079-17.

(2018)

51) Tsutsui A, Yahara K, Shibayama K. Trends and patterns of national antimicrobial consumption in Japan from 2004 to 2016. *J Infect Chemother.* **24**: 414-421. (2018)

52) Chetri S, Singha M, Bhowmik D, Nath K, Chanda DD, Chakravarty A, Bhattacharjee A. Transcriptional response of OmpC and OmpF in *Escherichia coli* against differential gradient of carbapenem stress. *BMC Res Notes.* **12**: 138. (2019)

53) Haldorsen B, Aasnaes B, Dahl KH, Hanssen AM, Simonsen GS, Walsh TR, Sundsfjord A, Lundblad EW. The AmpC phenotype in Norwegian clinical isolates of *Escherichia coli* is associated with an acquired ISEcp1-like *ampC* element or hyperproduction of the endogenous AmpC. *J Antimicrob Chemother.* **62**: 694-702.

(2008)

54) Paltansing S, Tengeler AC, Kraakman ME, Claas EC, Bernards AT. Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist.* **19**: 469-476. (2013)

- 55) Tomás M, Doumith M, Warner M, Turton JF, Beceiro A, Bou G, Livermore DM, Woodford N. Efflux pumps, OprD porin, AmpC beta-lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**: 2219-2224. (2010)
- 56) Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Takakura S, Ichiyama S. *In vitro* activities and detection performances of cefmetazole and flomoxef for extended-spectrum β -lactamase and plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **84**: 322-327. (2016)
- 57) Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* **8**: 557-584. (1995)
- 58) Nikaido H, Rosenberg EY, Foulds J. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with beta-lactams in intact cells. *J Bacteriol.* **153**: 232-240. (1983)
- 59) Ghai I, Ghai S. Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. *Infect Drug Resist.* **11**:523-530. (2018)
- 60) Shi W, Li K, Ji Y, Jiang Q, Wang Y, Shi M, Mi Z. Carbapenem and ceftazidime resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains associated with porin OmpK36 loss and DHA-1 β -lactamase production. *Braz J Microbiol.* **44**: 435-442. (2013)
- 61) Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited.

- Microbiol Mol Biol Rev.* **67**: 593-656. (2003)
- 62) 大和田 琢二, 匂坂 勝之助. 微生物の浸透圧調節. *化と生.* **28**: 360-368. (1990)
- 63) Phoenix DA. On the targeting and membrane assembly of the *Escherichia coli* outer membrane porin, PhoE. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **16**: 77-82. (1996)
- 64) Jacoby GA, Carreras I. Activities of beta-lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **34**: 858-862. (1990)
- 65) Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* **22**: 161-182. (2009)
- 66) Meini S, Tascini C, Cei M, Sozio E, Rossolini GM. AmpC β -lactamase-producing *Enterobacterales*: what a clinician should know. *Infection.* **47**: 363-375. (2019)
- 67) Nelson EC, Elisha BG. Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**: 957-959. (1999)
- 68) Caroff N, Espaze E, Gautreau D, Richet H, Reynaud A. Analysis of the effects of -42 and -32 *ampC* promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing *ampC*. *J Antimicrob Chemother.* **45**: 783-788. (2000)
- 69) Chetri S, Bhowmik D, Paul D, Pandey P, Chanda DD, Chakravarty A, Bora D, Bhattacharjee A. AcrAB-TolC efflux pump system plays a role in carbapenem non-susceptibility in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* **19**: 210. (2019)

- 70) Maurya N, Jangra M, Tambat R, Nandanwar H. Alliance of efflux pumps with β -lactamases in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Microb Drug Resist.* **25**: 1155-1163. (2019)
- 71) 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**: 1319-1327. (2015)
- 72) Kohanski MA, DePrist MA, Collins JJ. Sub-lethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell.* **37**: 311-320. (2010)
- 73) Dwyer DJ, Kohanski MA, Collins JJ. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Curr Opin Microbiol.* **12**: 482-489. (2009)
- 74) Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell.* **130**: 797-810. (2007)
- 75) Hayakawa S, Kawamura M, Sato T, Hirano T, Kikuchi T, Watanabe A, Fujimura S. An α -Lipoic acid derivative, and anti-ROS agent, prevents the acquisition of multi-drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother.* **25**: 28-33. (2019)
- 76) Moore JP, Li H, Engmann ML, Bischof KM, Kunka KS, Harris ME, Tancredi AC,

- Ditmars FS, Basting PJ, George NS, Bhagwat AA, Slonczewski JL. Inverted regulation of multidrug efflux pumps, acid resistance, and porins in benzoate-evolved *Escherichia coli* K-12. *Appl Environ Microbiol.* **85**: e00966-19. (2019)
- 77) Tavío MM, Vila J, Perilli M, Casañas LT, Maciá L, Amicosante G, Jiménez de Anta MT. Enhanced active efflux, repression of porin synthesis and development of Mar phenotype by diazepam in two enterobacteria strains. *J Med Microbiol.* **53**: 1119-1122. (2004)
- 78) Horner C, Mushtaq S, Livermore DM; BSAC resistance surveillance standing committee. Potentiation of imipenem by relebactam for *Pseudomonas aeruginosa* from bacteremia and respiratory infections. *J Antimicrob Chemother.* **74**: 1940-1944. (2019)
- 79) MSD 株式会社：レカルブリオ®配合点滴静注用 医薬品インタビューフォーム。改訂第3版（2021年11月改訂）
- 80) 岡 智. 食品防腐剤—その効果原理と実用性—. 日食工会誌. **12**: 338-348. (1965)
- 81) 松田 敏生. 化学物質による静菌と食品の保存. 日食工会誌. **38**: 454-464. (1991)
- 82) Foulds J, Murray DM, Chai T, Rosner JL. Cephalosporins through the outer

- membrane of *Escherichia coli* grown in salicylates. *Antimicrob Agents Chemother.* **33**: 412-417. (1989)
- 83) Shlaes DM. New β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations in clinical development. *Ann N Y Acad Sci.* **1277**: 105-114. (2013)
- 84) Goldstein EJC, Citron DM, Tyrrell KL, Leoncio E, Merriam CV. Comparative *in vitro* activities of relebactam, imipenem, the combination of the two, and six comparator antimicrobial agents against 432 strains of anaerobic organisms, including imipenem-resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother.* **62**: e01992–17. (2018)
- 85) Livermore DM, Warner M, Mushtaq S. Activity of MK-7655 combined with imipenem against *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* **68**: 2286-2290. (2013)
- 86) Young K, Painter RE, Raghoobar SL. *In vitro* studies evaluating the activity of imipenem in combination with relebactam against *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* **19**: 150. (2019)
- 87) Nomura S, Hanaki H, Nagayama A. Tazobactam-piperacillin compared with sulbactam-ampicillin, clavulanic acid-ticarcillin, sulbactam-cefoperazone, and piperacillin for activity against beta-lactamase-producing bacteria isolated from patients with complicated urinary tract infections. *J Chemother.* **9**: 89-94. (1997)

88) Castanheira M, Mills JC, Farrell DJ, Jones RN. Mutation-driven β -lactam resistance mechanisms among contemporary ceftazidime-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* **58**: 6844-6850. (2014)

論文目録

主論文 (原著論文)

1. Ryota Ito, Masato Kawamura, Takumi Sato, Shigeru Fujimura. Cefmetazole Resistance Mechanism for *Escherichia coli* Including ESBL-Producing Strains. *Infection and Drug Resistance*. **15**: 5867-5878. (2022)

参考論文 (原著論文)

1. Takashi Uno, Takumi Sato, Mariko Yagi, Ryota Ito, Masato Kawamura, Shigeru Fujimura. *In vitro* Rifampicin Combination Chemotherapy Confers Rapidly Rifampicin Resistance for Biofilm-Formed *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology*. **9**: 343. (2020)
2. Masato Kawamura, Ryota Ito, Yurina Tamura, Mio Takahashi, Miho Umenai, Yuriko Chiba, Takumi Sato, Shigeru Fujimura. Overproduction of Chromosomal *ampC* β -Lactamase Gene Maintains Resistance to Cefazolin in *Escherichia coli* Isolates. *Microbiology Spectrum*. **10**: e0005822. (2022)
3. Takumi Sato, Ryota Ito, Masato Kawamura, Shigeru Fujimura. The Risk of Emerging Resistance to Trimethoprim/Sulfamethoxazole in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Drug Resistance*. **15**: 4779-4784. (2022)