

検査や化学療法を混乱させる薬剤耐性菌の狡猾な耐性誘導機構

Tricky Resistance Induction of Antibiotic Resistant Microorganisms Confusing Clinical Diagnosis and Chemotherapy

— グラム陰性菌の耐性誘導を中心として —

— *Antibiotic resistance induction of gram negative bacteria* —

北里研究所抗感染症薬研究センター センター長 花木 秀明

HIDEAKI HANAKI Ph.D.

Director, Kitasato Research Center for Anti-infection Drugs

関東化学株式会社 試薬事業本部 ライフサイエンス部 久保 亮一

RYOICHI KUBO

Life Science Dept. Kanto Chemical Co., Inc.

1. はじめに

1928年のFlemingによるペニシリンの発見に始まる抗菌剤の開発は目覚しく¹⁾、今日の感染症治療において抗菌剤を中心とした化学療法は非常に重要な位置を占めている。しかしながら、他方においてこうした抗菌剤に抵抗を示す薬剤耐性菌も進化・発展を遂げ、様々な耐性機構によって、臨床の場を脅かすようになってきたばかりで無く、これらを発見するための臨床検査を難しくしている²⁾。特に大腸菌などに代表されるグラム陰性桿菌と呼ばれる細菌の一群は、耐性が多種・多様にわたり、全ての抗菌剤に対する耐性遺伝子が確認されてきている。

例えば、ペニシリンをはじめとするβ-ラクタム系抗菌剤には加水分解酵素によるβ-ラクタム環の分解³⁾、アミノグリコシド系抗菌剤には修飾酵素(aac, aph, aad)による薬剤の活性部位の失活⁴⁾、テトラサイクリン系薬剤に対しては薬剤排出ポンプによる菌体外への薬剤の排出⁵⁾、キノロン系薬剤に対しては、薬剤の標的部位変化による耐性獲得といったことで耐性獲得が認められている⁶⁾。

また耐性菌の機構は耐性遺伝子により制御されているが、最近の耐性菌においては以前と異なり、複数の遺伝子が獲得されて周囲の環境にあわせて耐性機構を調節しているので耐性の起きる機構が複雑なものになってきている^{7,8)}。特に、細菌の代謝調節機構である「オペロン機構」を利用した薬剤の「耐性誘導」は耐性の強さを常に周囲環境にあわせて変化させているので、耐性菌の検査や治療においては、こうしたメカニズムを理解して進めないと結果が分からなくなったり、治療に失敗したりといったことに繋がることになる。

そこで、本稿ではこうした耐性菌のメカニズムとこれに対する化学療法について、主にグラム陰性桿菌を例にとりて解説してみた。

2. 耐性機構の概要

先に述べたように薬剤耐性菌の示す耐性機構は様々であるが、大きく分けると次のように内因性と外因性に分けることができる。

2.1 内因性の耐性機構

細菌が本来、生物として持っている内在性の遺伝子よる耐性

- (1) 標的部位の変異:フルオロキノロン系薬剤耐性ではDNAジャイレースやトポイソメラーゼなど薬剤が標的とする酵素の作用部位が変化して攻撃できなくなる。
- (2) 分解酵素の過剰産生による耐性化:AmpC型β-ラクタマーゼによる広域セファロスポリン系薬やカルバペネム系薬の耐性化は、本来、これらの薬剤にはほとんど無視できるくらいの分解能しかない酵素であるAmpCが産生を抑制している調節遺伝子(サブレッサー遺伝子)の不活化により大量に産生されることで、結果としてこうした薬剤を無効にするほどの分解力が得られる⁹⁾。
- (3) 細胞外膜の変化による耐性化:細菌の細胞壁にある細胞外膜はポーリンと呼ばれる孔を通じて外部から栄養素を取り込む機能がある。カルバペネム系薬のイミペネムなどは塩基性アミノ酸を取り込むためのポーリン(D2ポーリン)を通じて菌体内に入り込むが、耐性菌はこの外膜を変化させてポーリンの数を減らし、薬剤

が体内に侵入しにくくすることで耐性を獲得する¹⁰⁾。

(4) 薬剤能動排出ポンプの亢進:フルオロキノロンや消毒液の耐性では、細菌の体内に入ったこれらの抗菌剤や殺菌物質をATPを使った能動輸送によって菌体外に排出している。

(5) バイオフィルムの形成¹¹⁾:緑膿菌やブドウ球菌などでは多糖類を産生し、これと生体中のフィブリンなどを組み合わせるマトリックスを作り、バイオフィルムと呼ばれる細菌の巣のようなものを構築する。バイオフィルムは物理的に細菌を抗菌剤や生体防御機構である抗体から守るため、すべての抗菌剤に対する耐性機構として働く。ただし、バイオフィルムの形成にはアルギン酸の結合が必須であるために、これを阻害するマクロライド系抗菌剤はバイオフィルムを作らせない為に有効である^{12,13)}。

2.2 獲得性の耐性機構

内因性の耐性機構に対して、外部からの耐性遺伝子の獲得によっても耐性が起こる。これは耐性菌の耐性遺伝子がプラスミドやトランスポゾンといった移動性の遺伝子集団にある場合、これが耐性を持たない細菌に接合やファージによって導入され、耐性を獲得するもので、ペニシリンなどのβラクタム系抗菌剤を分解するメタロ-β-ラクタマーゼの産生による耐性やアミノ配糖体の作用点を変異させて薬剤の親和性を下げて耐性を生むアミノ配糖体アセチル化酵素の産生、βラクタム系抗菌剤の作用点であるPBPと呼ばれる一連の細胞壁合成酵素を変異させて親和性を失わせて耐性を作るといったものがある¹⁴⁾。

一般に獲得性の耐性は、耐性の伝達を繰り返すことで変異を起こしやすい。例えば、上述のβ-ラクタマーゼの場合は図1に示すように色々な遺伝子型のものが数百にわたっており、しかもDNA上の数個の塩基配列が変わることで、全く違った種になるので膨大な種類が発生する¹⁵⁾。院内感染でこうした耐性菌が発生した場合、早期に発見して封じ込めないと使用できる抗菌剤の幅が急速に狭まって化学療法を困難なものにしてしまう可能性が高い。

以上をまとめると、耐性のメカニズムとしては

- (1) 微生物細胞内への薬剤の透過性の減少。
- (2) 微生物に浸透した薬剤を外部に排出する排出機構の促進。
- (3) 薬剤の標的となる酵素や物質の変異

(4) 標的酵素の産生の飛躍的増大(量が増大しているの
で一部が阻害されても機能が損なわれない)

(5) 薬剤そのものの不活性化といったことが知られている。

種類	報告されている 変異酵素	種類	報告されている 変異酵素
TEM	: 160	CMY	: 28
SHV	: 101	GES	: 9
OXA	: 105	VEB	: 5
CTX-M	: 67	KPC	: 4
IPM	: 23	PER	: 3
VIM	: 14	SME	: 3

図1 βラクタマーゼに見られる多様性

2.3 外部から取り込んで耐性化する場合

インフルエンザ菌は健康な人の鼻腔に通常でも存在するが、しばしば呼吸器系の疾患の原因となる。この場合、最もよく使われてきたのがアンピシリンであり、耐性はほとんど認められないと考えられてきた。ところが、近年、アンピシリン耐性のインフルエンザ菌が現れて問題となってきた¹⁶⁾。アンピシリン耐性のインフルエンザ菌にはβ-ラクタマーゼを産生して耐性となっているもの(BLPAR: β-lactamase positive Ampicillin resistant Haemophilus influenzae)とβ-ラクタマーゼを産生せずにβ-ラクタム系抗菌剤の標的部位である細胞壁合成酵素PBP3を産生する遺伝子*ftsI*が変異してMRSAのようにβ-ラクタム系抗菌剤に親和性のないPBPを作って攻撃を受けないようにするもの(BLNAR: β-lactamase negative Ampicillin resistant Haemophilus influenzae)およびこれら2つの機構のどちらも獲得して耐性となったもの(BLPACAR: β-lactamase positive amoxicillin/clavulanic acid resistant Haemophilus influenzae)がある。これらは、口腔に存在するレンサ球菌がこうした変異遺伝子を持っており、これらが死滅して出てきた変異遺伝子をインフルエンザ菌が取り込んで形質転換の形で耐性を獲得する。BLNARの*ftsI*遺伝子の変異する部位が3カ所あり、変異数が多いほど耐性は高度となるが、生方らは¹⁷⁾感受性の違いを配慮して2カ所以上の変異が起きたものをBLNAR、1カ所だ

けのものをLowBLNARとして分けており、Dabernatら¹⁸⁾はさらに、これを進めて6つに分類している。

3. 耐性はどのように起こるか

我々が耐性という現象を認知する場合、2つのパターンがあることに気がつく。1つは、誘導型の耐性でオペロンと呼ばれる調節機構を駆使して、薬剤にさらされているかどうかに応じて耐性遺伝子を発現させたり、停止したりするという巧妙な機構“誘導”が使われているものである。すなわち、耐性遺伝子を作動させるプロモータ遺伝子と呼ばれる遺伝子(群)に薬剤のない環境下では、これを止めるリプレッサーが働いて鍵をかけているが、薬剤にさらされるとリプレッサーが解除されて耐性遺伝子が作動して耐性を発現するが、薬剤がなくなると再びリプレッサーが働いて耐性を抑える。一般的に薬剤耐性という機能は微生物にとっての本質である「発育・増殖」に使うべき代謝エネルギーの一部をこの機能に振り向けなければならないため、非常に不利である。したがって、周囲の環境に薬剤がないか攻撃できない濃度まで下がれば、即刻、この耐性機能を停止して本来の「発育・増殖」にエネルギーを振り向けるのが微生物側としては合理的なわけである。ところが、病原微生物の検出は一般的に検査材料を分離培地によって個々の細胞を分離して検出するが、この段階では薬剤に“さらす”様な配慮はされないために、耐性が隠れてしまい耐性菌としての検出が困難となってしまう。もう1つは構成型の耐性で、この性質をもつ耐性菌は常時耐性を保つために耐性が現れたり消えたりすることがなく検査や診断が容易である。これらは、もともと合理的な「誘導型」の耐性であったものが、連続して長期間にわたって薬剤にさらされたためにリプレッサーが働かなくなってしまったもので一般に高度耐性である。1980年代に日本で院内感染として問題視されたMRSAをはじめとする耐性菌はこの耐性型が多かったために比較的検査はしやすかったが、今日問題となっている市中感染や耐性菌は「誘導型」であるためにこれまでの検査では検出が難しくなっている。

4. 誘導性の耐性因子

誘導型の耐性は、大きく分けて3つ考えられる。つまり、β-ラクタマーゼ産生、アミノ配糖体修飾酵素の産生、薬

剤排出機構がある。

4.1 β-ラクタマーゼ産生による耐性

β-ラクタマーゼは既述したようにβラクタム系抗菌剤を加水分解して不活性化する酵素であるが、この産生を支配している遺伝子はその種類が膨大でわずかな変異で性質が大きく変わるので、PCRをはじめとする遺伝子検査で未知のβ-ラクタマーゼを検査することは事実上不可能である。臨床的に現在問題とされている耐性菌が産生する進化したβラクタマーゼには、基質拡張性βラクタマーゼ(ESBL:Extended Spectrum Beta Lactamase)、メタロβラクタマーゼ(MBL:Metallo Beta Lactamase)、大量産生型AmpCといったものがあるが、これらは化学療法で重要とされる第3世代セフェムを分解するために、治療を難しくすることが多い。

特に大量産生型AmpCは例外¹⁹⁾を除き、ESBLやMBLのように酵素そのものが進化して抗菌剤に対する分解力が拡大してきたのではなく、単位あたりの分解能力は弱いが、先に述べた誘導によって酵素を大量に出すことで耐性を獲得しているの、誘導が十分行われていないと検出を誤ることがある。この場合の誘導は、Cristensenらによって明らかにされているが図2に示すようにβ-ラクタム系抗菌剤によって発生するムレインモノマー断片量が、これをリサイクルする回路の処理を上回ってくると余剰のムレインモノマー断片がリプレッサーとして働くという、やや複雑な機構である。

図3には、こうした耐性菌の年次傾向を示したが、MBLなどが増加してきていることがわかる。

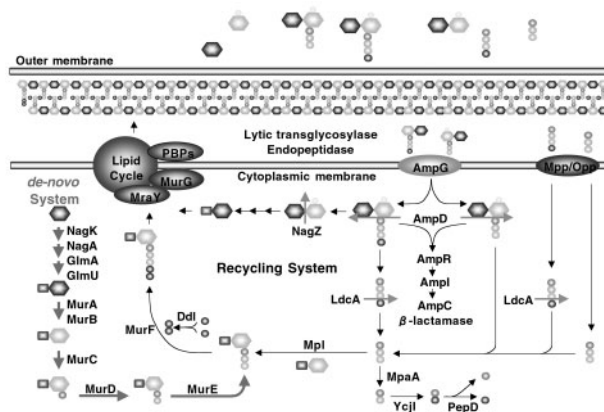


図2 ムレインモノマー断片とリサイクル機構による誘導

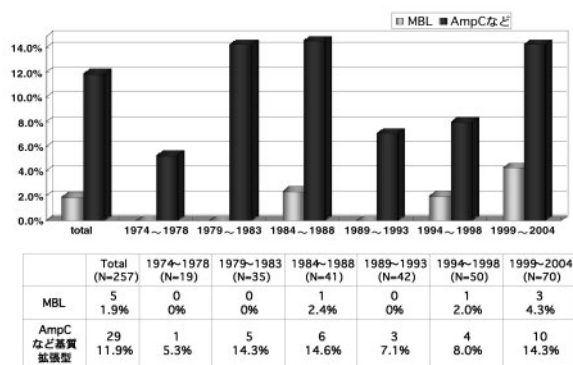


図3 ESBL、MBLとAmpCなどの基質拡張型β-lactamaseの検出年次推移

ESBLに見られるTEMやSHV型といったβ-ラクタマーゼは、進化を拡大して現在使われている第3世代セフェムの抗菌剤も壊す性質を得ているので、進化前の分解力の弱いTEMやSHVと遺伝的にPCRで調べることは非常に難しい。また、数種類のβ-ラクタマーゼが染色体にあって働いている場合や不能になっている場合もあるので、確実に遺伝的に解析しようと思うと、遺伝子シーケンスを同定することになるが、これは検査室では不可能である。

β-ラクタマーゼ産生菌で取って患者の症状などからβ-ラクタム系抗菌剤に頼らなければいけない場合は、最も抗菌力の期待されるカルバペネム系β-ラクタム剤が選ばれることになるが、メタロβ-ラクタマーゼには効果がなく、表1に示すようにAmpCの大量産生による耐性菌にも効果がないことがあるので、臨床的にはこれらのβ-ラクタマーゼを産生するかどうかを確認することも有用である。最近、問題になっている多剤耐性緑膿菌(MDRP)のカルバペネム耐性はこのMBL産生あるいはAmpCの大量産生によることが多い²⁰⁾。

表1 AmpC産生緑膿菌(株)の薬剤感受性

Antibacterial agents	MIC range (μg/mL)	MIC ₅₀ (μg/mL)	MIC ₉₀ (μg/mL)
PIPC	8 ~ >256	128	>256
CAZ	4 ~ 256	32	128
CPZ	8 ~ >256	128	>256
CPR	4 ~ 128	64	128
CZOP	2 ~ 128	16	64
IPM	1 ~ 32	2	32
MEPM	≤0.25 ~ 128	1	64
SBT/CPZ	16 ~ 256	64	128
TAZ/PIPC	8 ~ >256	128	256
AZT	8 ~ 256	16	128
LVFX	0.5 ~ >256	1	4
CPFX	≤0.25 ~ 256	≤0.25	1
PZFX	≤0.25 ~ 256	0.5	4
AMK	1 ~ 256	8	16
TOB	≤0.25 ~ >256	1	256
ABK	1 ~ 128	4	16
MINO	16 ~ >256	32	256

4.2 アミノ配糖体不活化酵素産生による耐性

アミノ配糖体不活化酵素はアミノ配当体系抗菌剤(アミカシン、ハベカシン、トブラマイシンなど)の活性部位であるアミノ基と水酸基をアセチル化、アデニル化、リン酸化といった有機化学的な修飾を行うことで不活化する。図4は北里研究所において過去30年間に、集められた血液から分離されたアミノ配糖体系抗菌剤耐性菌株255株の成績であるが高濃度耐性の細菌が増加しているのがわかるであろう。表2はβ-ラクタマーゼ産生緑膿菌の薬剤感受性パターンを見たものであるが、β-ラクタマーゼ産生菌はアミノ配糖体系抗菌剤にも耐性であることがわかっている。この事は、β-ラクタマーゼ産生が発現すると近傍にあるアミノ配糖体耐性遺伝子が刺激されて発現することが示唆される。

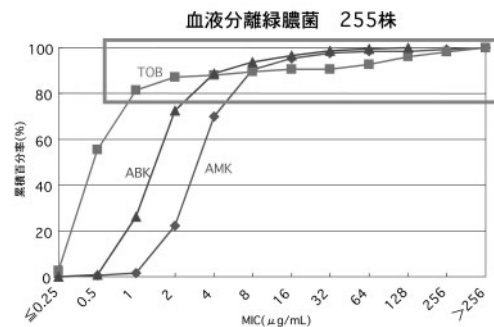


図4 Aminoglycoside系薬の抗菌力

表2 AmpC産生緑膿菌(株)の薬剤感受性

Antibacteri ag@hts	MBL(5株 0.2%)		AmpC(26株 10.5%)		その他(217株)	
	MIC ₅₀ (μg/mL)	MIC ₉₀ (μg/mL)	MIC ₅₀ (μg/mL)	MIC ₉₀ (μg/mL)	MIC ₅₀ (μg/mL)	MIC ₉₀ (μg/mL)
PIPC	32	256	128	>256	8	16
CAZ	>256	>256	32	128	4	16
CPZ	>256	>256	128	>256	8	32
CPR	256	256	64	128	8	16
CZOP	>256	>256	16	64	2	8
IPM	256	>256	2	32	2	8
MEPM	>256	>256	1	64	0.5	2
SBT/CPZ	>256	>256	64	128	16	32
TAZ/PIPC	32	64	128	256	8	32
AZT	8	32	16	128	8	16
LVFX	4	4	1	4	1	4
CPFX	1	1	≤0.25	1	≤0.25	1
PZFX	2	4	0.5	4	0.5	2
AMK	256	>256	8	16	4	8
TOB	128	256	1	256	0.5	2
ABK	8	32	4	16	2	4
MINO	64	64	32	256	16	64

4.3 薬剤排出機構による耐性

薬剤を分解・不活化できない場合は、薬剤を取り込まない、あるいは取り込まれた薬剤を体外に排出するという耐性を得るものがある。図5はこの2つの機構を模式化したものであるが、薬剤の取り込みを少なくする方法としてはD2ポーリンの減少が有名である。D2ポーリンは細菌に必要な塩基性アミノ酸の取り込み口の働きをするもの

で、カルバペネム系薬剤のイミペネム (IMP) はこの経路を通して細菌の体内に侵入して攻撃するため、耐性はこのポーリンそのものの数を少なくして行われる。ただし、ポーリンは細菌自体にとっても重要なために数を少なくするにも限界がある。そこでATPを使った能動輸送であるプロトンポンプを使って、一度体内に侵入した薬剤を排出する方法がとられる。これによる耐性はテトラサイクリン系やキノロン系抗菌剤の場合によく見られる。排出ポンプの種類はこれまでに MexA-MexB-OprM, と MexC-MexD-OprM, MexE-MexF-OprM, MexX-MexY-OprM の4種類がみつがっている。

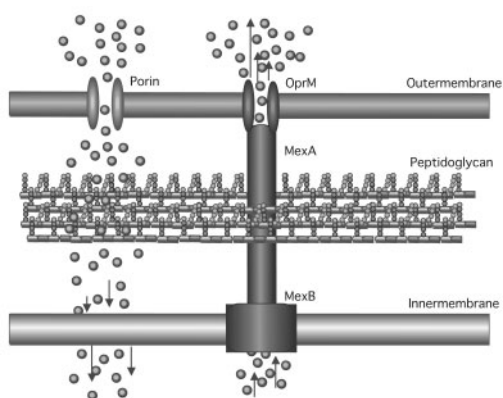


図5 内因性の耐性間メカニズム

β -ラクタム系抗菌物質には MexA-MexB-OprM が主に働くが、アミノ配糖体系抗菌剤では MexX-MexY-OprM が主として働くとされる。図6はこのプロトンポンプ部分の模式を拡大したものであるが、テトラサイクリンなどの抗菌剤はマグネシウムイオンと結合させる形で、マグネシウムを排出してプロトンを導入するというプロトンポンプ系を利用している。

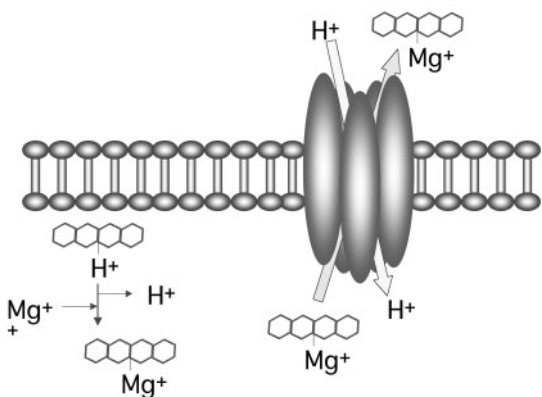


図6 プロトンポンプによる排出

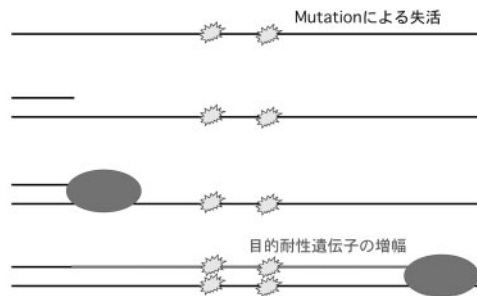


図7 耐性遺伝子の突然異変による失活

耐性能力をなくした遺伝子でもPCRでは増幅されたい耐性遺伝子陽性となる。しかしながら、耐性は発現しないので感受性試験は感受性となる。

5. 耐性菌の検査法における注意

これまで述べてきたように耐性菌の検出・測定には、耐性の誘導をあらかじめ十分行っておくことが大切である。シカ β テストやニトロセフィンで β -ラクタマーゼを直接見る場合のように、臨床検体の状況をそのまま見る場合は、基本的には患者の体内において投与された薬剤の影響が強く、誘導はかかっていると考えられるので検体が新鮮なうちに検査するならば、そのまま感受性や耐性の試験に用いたほうがよい場合がある。特に継代培養などを抗菌剤を含まない培地で繰り返すと、耐性遺伝子を含むプラスミド脱落したり、耐性遺伝子の発現が止まったりするので注意が必要である。

耐性の誘導には一般的に最小発育阻止濃度(MIC)の半分の濃度で培養するのが良いとされるが、未知検体では感受性検査によってMICが決まるまで耐性の検査ができないというのは不便であるし、時間的にもロスである。そこで、著者らは適当な寒天培地(ミュラーヒントン培地やブレインハートインフュージョン培地)に耐性を疑う菌を塗抹して β -ラクタム抗菌剤を含むディスクを置き、35 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ Cで24時間程度培養し、ディスクの周縁にできた阻止帯の周縁のコロニー(細胞)を取ることを薦めている。この方法を用いると作業が簡単だけでなく、MICの値が不明でも、抗菌剤の圧力が適当にかかって誘導された状態のコロニーを得ることができる。

誘導を引き起こす抗菌剤は種類によってその誘導能が高いものそれほどでないものがある。誘導はムレインモノマー断片のような細胞壁の部品が関与していることが多く、セファマイシン系抗菌剤やカルバペネム系抗菌剤といった細胞壁を壊す作用のある抗菌剤は誘導能が

強く、セフトジジム (CAZ) やセフトキシム (CTX) 第3世代のセフェム剤は誘導能が弱いようである。

PCRをはじめとする遺伝子診断は耐性を疑う病原菌の耐性遺伝子があるかどうかを調べる上で有力な手段である。しかしながら、遺伝子は耐性能力を失ったいわゆる「壊れた」遺伝子かどうかといったことや、発現が実際行われているかといったことはわからない。こうした場合、発現を検査する感受性試験と遺伝子検査では当然不一致が出てくる。さらに、ESBLのように種類が多く変異しやすい場合はPCRなどは前述のように拾いきれないのでスクリーニング検査には使えない。

6. まとめ

これまで耐性菌は常にその耐性を示す構成型が多かったために、薬剤感受性試験を簡易なディスク拡散法で行っていただくと、せいぜいβ-ラクタマーゼ産生試験を追加すればよいというものであった。しかしながら、誘導型の出現が顕著になるに従って、耐性菌に向き合うにはその耐性機構をよく理解して出てきた検査成績を読まなければならなくなってきた。また、抗菌剤の投与も感受性試験で感受性となった薬剤を適当に選択して単剤を投与するという単純なものでは効果が得られないことが多くなってきたため、薬剤の体内動態をモニタリング (TDM) して適切な量を投与したり、投与も感受性のある薬剤とクラブラン酸やタンパク質といった阻害剤を投与して相乗効果をねらったり、作用点の異なる抗菌剤を併用したりすることが推奨されるようになってきた。耐性菌は化学療法の発展と共に常に変化してきており、これに対応する検査や治療も発展してゆかなければならない。今後、診断の迅速化や検査技術の精度管理といったことともに耐性や細菌の代謝といった基礎的な知識がますます要求されてくるであろう。

参考文献

- 1) A.Fleming, *British Journal of Experimental Pathology*, **10**, 226-236 (1929)
- 2) 科学技術庁研究開発局, 院内感染対策に関する緊急研究成果報告書 (平成11年度)
- 3) K.Bush et.al., *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **39**, 1211-1233 (1995)
- 4) S.Kondo et.al., *The Journal of Antibiotics*, **46**, 310-315 (1993)
- 5) K.Poole et.al., *The Journal of Bacteriol.*, **175**, 7363-7372 (1993)
- 6) H.Ito et.al., *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **38**, 2014-2023 (1994)
- 7) F.Jacob, J.Monod, *Journal of Molecular Biology*, **3**, 318 (1961)
- 8) J.H.Miller et.al., *Journal of Molecular Biology*, **38**, 413, (1968)
- 9) C.Jacobs et.al., *Cell*, **88**, 823-832 (1997)
- 10) S.Satake et.al., *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **34**, 685-690 (1990)
- 11) L.Dall et.al., *Journal of Infection Disease*, **156**, 736 (1987)
- 12) 佐野正人他, 日本泌尿器科学界誌, **88**, 596-604 (1997)
- 13) 小野憲昭他, 日本化学療法学会誌, **43**, 222-230 (1995)
- 14) B.J.Hartman et.al., *Journal of Bacteriology*, **158**, 513-516 (1984)
- 15) 荒川宣親, 日本臨床微生物学雑誌, **13**, 3, 12-23 (2003)
- 16) S.M.Markowiz et.al., *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **17**, 80-83 (1980)
- 17) K.Ubukata et.al., *Antimicrobial Agent Chemotherapy*, **45**, 1693-1699 (2001)
- 18) H.Dabernat et.al., *Antimicrobial Agent Chemotherapy*, **46**, 2208-2218 (2002)
- 19) S.Haruta et.al., *Microbiol. Immunol.*, **45** (4), 277-283 (2001)
- 20) S.Satake et.al., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **28**, 199-207 (1991)