

氏名（本籍）	瀬山 翔史（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 283 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目	インフルエンザ菌の薬剤耐性に関する研究
--------	---------------------

論文審査委員	（主査）	教授	野口	雅久
		教授	平野	俊彦
		教授	下枝	貞彦

論文内容の要旨

インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) は、中耳炎、副鼻腔炎などの上気道感染症や気管支炎などの下気道感染症、肺炎、さらに髄膜炎などの重症感染症の起因菌となる。特に、小児科領域において、臨床上重要な病原体である。本菌の感染症治療には、主に β -lactam 系薬が使用されるが、その耐性菌である β -lactamase-producing ampicillin-resistant *H. influenzae* (BLPAR) と β -lactamase-non-producing ampicillin-resistant *H. influenzae* (BLNAR) がすでに流行している。日本では、BLNAR が多く、cephem 系薬を含む一部の β -lactam 系薬の感受性が低下している。そのため、BLNAR による感染症には、macrolide 系薬や fluoroquinolone 系薬が代替薬として使用されている。しかし、成人から分離される *H. influenzae* では、これらの代替薬に対して感受性が低い株（低感受性株）が報告されている。近年、日本の小児科領域では、新規抗菌薬の導入や適応の拡大に伴い抗菌薬の使用法及び使用量が大きく変化している。これは、*H. influenzae* が曝露される抗菌薬の種類が変化していることを意味しており、その影響が懸念される。

そこで、本研究では、抗菌薬導入に伴う *H. influenzae* の各種薬剤感受性の影響ならびにその関連性と有効な抗菌薬を明らかにするため、単一医療施設を対象とした長期的な分子レベルの疫学解析を行った。さらに、*H. influenzae* の各種抗菌薬に対する耐性化のメカニズムを詳細に解析した。

第 1 章: BLNAR の分子疫学解析

BLNAR に有効な治療薬と抗菌薬感受性の動向を明らかにするため、2007 年から 2012 年の間の各種抗菌薬感受性の変化を検討した。

菌株は、2007 年から 2012 年に東京医科大学八王子医療センターにおいて、BLNAR

として分離された 304 株を用いた。各種薬剤感受性は、微量液体希釈法により測定し、最小発育阻止濃度 (MIC) から判定した。

いずれの年度に分離された株も、meropenem や tebipenem、levofloxacin (LVFX)、tosufloxacin (TFLX) に対して、良好な感受性を示していた。一方で、macrolide 系薬である clarithromycin (CAM) に対して、低度耐性株 (MIC = 16 µg/mL) と耐性株 (MIC ≥32 µg/mL) が認められた。CAM 低度耐性株と耐性株の割合を年次で解析したところ、azithromycin (AZM) 小児細粒導入後 (2009 年)、CAM の感受性率は、2010 年を境に減少し、2012 年には、52.9%に低下していた (Fig. 1)。また、2007 年から 2009 年と 2010 年から 2012 年の 3 年間を比較すると、感受性率が有意に低下していた ($P < 0.05$)。さらに、CAM 耐性株の出現が認められた ($n = 12$)。次に、CAM 耐性株の遺伝学的背景を multilocus sequence typing (MLST) 法で解析したところ、9 種の異なる遺伝子型が認められた。従って、CAM 耐性株は特定の株が流行しているわけではなく、遺伝学的多様性があることが示された。

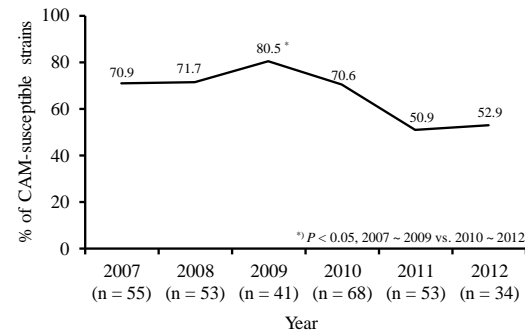


Fig. 1. Annual transition of clarithromycin-susceptible strains in BLNAR *H. influenzae*

本章より、BLNAR において、CAM 低度耐性株が増加していることが明らかになった。加えて、CAM 耐性株も出現していた。これは、市中感染症に対して macrolide 系薬の使用頻度が上がったため、この選択圧を受けたことに起因すると考えられる。また、CAM 耐性株は、特定のクローンの株が流行しているわけではなく、独立して出現しているため、どの株でも CAM に対して耐性化し得ることが強く示唆された。

第 2 章: Macrolide 耐性の分子メカニズムの解析

第 1 章において、BLNAR の CAM 耐性株の出現を見出した。そこで、この CAM 耐性の分子メカニズムを研究した。

菌株は、2010 年から 2012 年の間に分離された 7 株の CAM 耐性 BLNAR を用いた。

まず、既知の macrolide 耐性遺伝子 *mef(A)* と *erm(B)* の検出及びリボソームタンパク L4 と L22 の変異を解析した。その結果、*mef(A)* と *erm(B)* は検出されず、L4 と L22 中にアミノ酸置換を伴う変異も認められなかった。次に、排出タンパクによる macrolide 耐性を調べた。排出ポンプ阻害剤を添加し、MIC を測定したところ、CAM 耐性株の CAM 及び AZM の MIC は、排出ポ

Table 1. MICs of CAM-resistant BLNAR and CAM-susceptible BLNAR *H. influenzae*

Strain	CAM	CAM MIC + CCCP (µg/mL)		AZM	AZM MIC + CCCP (µg/mL)	
		0.75	1.5		0.75	1.5
2010-124	32	16	1	4	2	0.13
2011-54	32	16	4	4	2	0.5
2011-70	32	16	4	4	1	0.25
2011-72	32	16	1	4	1	≤0.06
2011-82	32	16	0.5	4	2	0.13
2012-42	32	16	4	8	4	1
2012-46	32	16	4	4	2	0.5
2011-130	1	1	1	0.13	≤0.06	≤0.06
ATCC49247	2	2	1	0.25	0.25	≤0.06
<i>H. influenzae</i> Rd	8	4	0.25	0.5	0.5	≤0.06
<i>H. inf</i> Rd _{42acr}	32	16	2	8	4	0.5

CCCP, Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone; CAM-resistant strain, CAM MIC ≥32 µg/mL; CAM-susceptible strain, CAM MIC ≤8 mg/mL; *H. inf* Rd_{42acr}, Rd strain transformed with the *acrR* gene from strain 2012-42.

ンブ阻害剤の濃度依存的に低下した (Table 1)。そこで、CAM 耐性 2012-42 株、感受性 2011-130 株と ATCC49247 株の染色体性多剤排出ポンプ遺伝子 (*yieO*、*ydeA*、*emrB*、*norM*、*acrB*) について mRNA 量を半定量的 RT-PCR 法で解析した (Fig. 2)。その結果、CAM 耐性株の *acrB* 遺伝子の転写量のみが、CAM 感受性株と比較して有意に高かった ($P < 0.05$)。さらに、耐性株と感受性株の *acr* 領域 (*acrR*、*acrA*、*acrB*) の DNA シーケンスを行い、標準株で

ある *H. influenzae* Rd 株の *acr* 領域と比較した。全ての耐性株で、*acrAB* の負の調節因子をコードする *acrR* 中に遺伝子欠損あるいは挿入が認められ、フレームシフトに伴いナンセンス変異が生じていた。さらに、CAM 耐性 2012-42 株の *acr* 領域を標準株の *H. influenzae* Rd 株に導入したところ、2012-42 株と同じ MIC 値を示した (Table 1)。また、形質導入株の *acrB* 遺伝子転写量は、親株である *H. influenzae* Rd 株と比較して有意に高かった ($P < 0.05$) (Fig. 2)。加えて、2012-42 株は、AZM にも低度耐性を示したことから、*acrR* に同じ変異をもつ CAM 耐性 AZM 感受性株 (2011-70) の *Acr* 領域と比較解析を行った。その結果、2012-42 株のみ、*AcrB* の 327 番目のアミノ酸置換が認められた。

H. influenzae Rd 株にこれら 2 つの株に由来する *Acr* 領域を導入し、アミノ酸置換の有無による影響を比較したところ、このアミノ酸置換を持つ株は、AZM の MIC 値が 2.3 倍高かった。

以上の結果より、CAM 耐性株は、薬剤排出ポンプ *acrAB* の調節因子である *acrR* 中のナンセンス変異により、負の調節機構が破綻し、排出ポンプが亢進することで耐性化したことが示された。また、*acrR* の変異部位は様々であった結果から、CAM 耐性化は、抗菌薬の選択圧によって、生じ得ることが示唆された。さらに、*acrR* 変異株は、*acrB* に点変異を獲得すると段階的に AZM に対しても低度耐性を示すことを明らかにした。

第 3 章：小児由来株における fluoroquinolone 低感受性株の増加

近年、高齢の患者から分離された *H. influenzae* において、fluoroquinolone 系薬の耐性株が検出されている。日本では、これまで小児の呼吸器疾患に対して fluoroquinolone 系薬は適応されていなかったが、2010 年に、TFLX の適応が小児に拡大された。そこで、対象を *H. influenzae* 全体に広げ、東京医科大学八王子医療センターの小児科由来株における fluoroquinolone 系薬の薬剤感受性の変化及び fluoroquinolone 標的遺伝子 (*gyrA*、*parC*) の解析を行った。

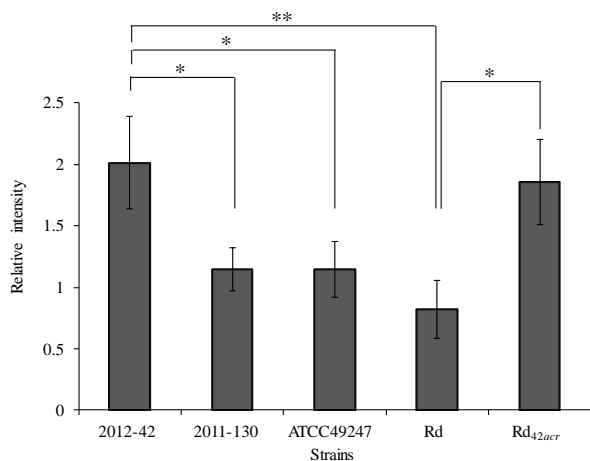


Fig. 2. Transcription level of *acrB* gene in *H. influenzae* 2012-42, CAM-resistant strain; 2011-130, CAM-susceptible strain; ATCC49247, CAM-susceptible control strain; Rd, *H. influenzae* Rd; Rd42acr, Rd strain transformed with the *acrR* gene from strain 2012-42. *) $P < 0.05$, **) $P < 0.01$

菌株は、2013年から2014年に小児科で分離された計96株の*H. influenzae*を用いた。

成人に汎用されるLVFXと小児適応のあるTFLXについて詳細に解析を行ったところ、全ての株が感受性を示した (Fig. 3)。しかし、2014年にはLVFXの感受性ピークから外れた

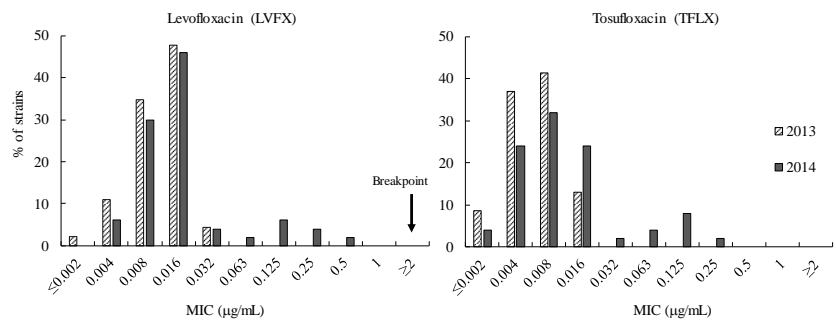


Fig. 3. MIC distribution of two fluoroquinolones in clinical *H. influenzae*

MIC 0.063 µg/mL以上を示す明らかな低感受性株が認められた。これらの菌株について、GyrAとParCのfluoroquinolone耐性決定領域におけるアミノ酸置換の解析を行ったところ、LVFX低感受性株では、GyrAの84番目のSerがLeuに置換 (S84L) していた (Table 2)。GyrAのS84Lを保有するLVFX低感受性株は、2013年では認められなかったが、2014年では、14%と有意に増加していた ($P < 0.05$)。そこで、このS84Lのアミノ酸置換を検出できるようにプライマーを設計し、PCRによる検出法を開発した。本手法の感度と特異度は、それぞれ100%と98.9%であり、本手法の有用性が示された。

Table 2. MIC for fluoroquinolones and amino acid substitutions in GyrA and ParC

Strain	MIC (µg/mL)						QRDR ^a substitution	
	LVFX	TFLX	CPFX	MFLX	NFLX	STFX	GyrA	ParC
ATCC49247	0.008	0.004	0.004	0.008	0.032	≤0.002	-	-
Rd	0.008	0.004	0.004	0.004	0.032	≤0.002	-	-
2014-46	0.5	0.25	0.25	0.25	1	0.016	S84L	-
2014-68	0.125	0.063	0.125	0.125	0.125	0.016	S84L	N138S
2014-72	0.063	0.063	0.063	0.125	0.25	0.004	S84L	S133A, N138S
2014-74	0.125	0.125	0.125	0.125	0.5	0.016	S84L	N138S
2014-88	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25	0.008	S84L	-
2014-90	0.25	0.125	0.125	0.25	0.25	0.032	S84L	-
2014-96	0.25	0.125	0.125	0.25	0.5	0.016	S84L	-

QRDR: quinolone resistance determining region; A, alanine; S, serine; N, asparagine; L, leucine; -, no substitution, LVFX, levofloxacin; TFLX, tosufloxacin; CPFX, ciprofloxacin; MFLX, moxifloxacin; NFLX, norfloxacin; STFX, sitafloxacin

これまでの報告から、S84Lに加え、もう一つアミノ酸置換が入ると耐性株となることが報告されている。つまり、小児領域では、fluoroquinolone耐性化の初期段階である*H. influenzae*が増加していることを示している。従って、更なる耐性化を防ぐためには、抗菌薬の適正使用と低感受性化の状況の把握が必要であると考えられる。また、その際、本研究で開発した簡易検出法はquinolone系薬を適正に選択する上で、有用なツールとなり得ることが示された。

第4章：外来性遺伝子を保有する多剤耐性*H. influenzae*の出現とその遺伝学的特徴

第3章の薬剤感受性に関する疫学解析において、2014年に小児科で喀痰から分離された株中に、penicillin、macrolide、tetracycline系薬に高度耐性を示す2014-102株を見出した。2014-102株は、第1章及び第2章で分離及び解析した*acrR*変異によるCAM耐性株とは異なり、全てのmacrolide系薬に高度耐性を示した。そこで、macrolide耐性機構の解析を行った。その結果、2014-102株は、macrolide排出ポンプをコードする*mef(A)*遺伝子を保有していた。*mef(A)*遺伝子周辺領域の塩基配列を解析したところ、tetracycline耐性に関与する*tet(M)*遺伝子が*mef(A)*遺伝子の近傍に存在していた。こ

の遺伝子領域は、*Streptococcus pneumoniae* の Tn916-family transposon 上の配列と 99% の相同性を示した (Fig. 4)。以上の結果より、同じ上気道に存在する *S. pneumoniae* から水平伝播によって、*mef(A)* 遺伝子及び *tet(M)* 遺伝子を獲得した多剤耐性 *H. influenzae* が出現したことが強く示唆された。

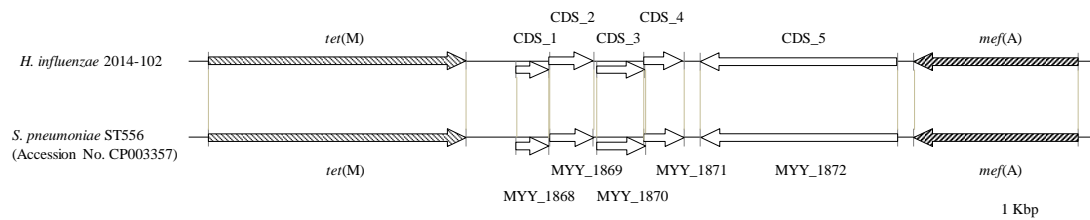


Fig. 4. Gene of organization of flanking regions of the *tet(M)* and *mef(A)* genes

総括

近年、薬剤耐性 (AMR) は、グローバルな社会問題として重要視されている。本邦では、cephem 系薬、fluoroquinolone 系薬及び macrolide 系薬の不適切な使用が AMR の一因として考えられる。本研究では小児科領域における抗菌薬の新規導入や適応拡大が、*H. influenzae* の薬剤感受性に影響し、fluoroquinolone や macrolide 系薬に対する低感受性株や低度耐性株の増加に加え、macrolide 系薬耐性株の出現をもたらしている可能性を示した。さらに、これらの薬剤に対する耐性機構は主に関連遺伝子の変異によることを明らかにした。また、*mef(A)* 及び *tet(M)* を内包するトランスポゾンを獲得したと考えられる多剤高度耐性株を初めて見出した。これらの成果は、小児科領域で多剤耐性化が急速に進行していることを示している。

市中で分離される *H. influenzae* の多くが β -lactam 系薬に耐性を示すため、macrolide 系薬や fluoroquinolone 系薬のような代替薬の感受性低下は、適応薬が限られる小児において治療上深刻な問題である。本研究で得られた *H. influenzae* の経時的な薬剤感受性サーベイランスや薬剤耐性機構の解明は、新規抗菌薬開発の手がかりに加え、*H. influenzae* 耐性菌の出現及び伝播を抑制するための抗菌薬適正使用に有益な情報を付与し、国際的問題である AMR 対策に貢献することができると考える。

【研究成果の掲載誌】

- (1) *J Glob Antimicrob Resist.* **6**: 22-26. (2016)
- (2) *Antimicrob Agents Chemother.* **60**: 3207-10. (2016)
- (3) *Antimicrob Agents Chemother.* **61**: e01337-17. (2017)
- (4) *Pediatr Infect Dis J.* **36**: 263-266. (2017)
- (5) *J Antimicrob Chemother.* **72**: 948-949. (2017)
- (6) *J Antimicrob Chemother.* **72**: 1846. (2017)

論文審査の結果の要旨

インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) は、小児領域における呼吸器感染症などの主な起炎菌であり、その治療には β -lactam 系薬が汎用されている。近年、本菌の β -lactam 系薬耐性菌 (BLNAR) が臨床上問題となっており、日本の小児領域では、代替薬となり得る macrolide や fluoroquinolone 系薬が導入されている。そのため、小児領域における抗菌薬の使用法や使用量が大きく変化しており、*H. influenzae* への薬剤感受性の影響が懸念されている。瀬山氏は、抗菌薬導入に伴う *H. influenzae* の各種薬剤感受性の変化ならびにその関連性と有効な抗菌薬を明らかにするため、単一医療施設を対象とした長期的な分子レベルの疫学解析を行った。さらに、本疫学調査で見出された薬剤耐性 *H. influenzae* の耐性化メカニズムを詳細に解析した。

第1章では、BLNAR に対する抗菌薬感受性の動向を明らかにするため、各種抗菌薬感受性の変化を調査した。その結果、macrolide 系薬の clarithromycin (CAM) の感受性率は、azithromycin (AZM) 導入後に減少し、出現した CAM 耐性株は遺伝学的多様性があることを見出した。第2章では、CAM 耐性の分子メカニズムを研究した。CAM 耐性株では、染色体性多剤排出ポンプ遺伝子である *acrAB* の負の調節因子をコードする *acrR* 中にナンセンス変異が生じ、この変異により、薬剤排出ポンプが亢進し、耐性化していることを示した。さらに、*acrR* 変異株は、*acrB* に点変異を獲得すると段階的に AZM に対しても低度耐性を示すことを明らかにした。第3章では、小児領域において、quinolone 系薬の tosfloxacin が新規導入されたため、その薬剤感受性への影響について解析した。その結果、導入後に quinolone 低感受性株が出現していることを示した。また、これらの菌株は、GyrA の quinolone 耐性決定領域における 84 番目の Ser が Leu に置換 (S84L) していることを見出した。そこで、初期の耐性化に関与する S84L のアミノ酸置換を検出できるように PCR を用いた検出法を開発した。この簡易検出法は quinolone 系薬を適正に選択する上で、有用なツールとなり得ると考えられる。第4章では、*acrR* 変異株とは異なり、新たに、全ての macrolide 系薬に高度耐性を示す株を見出した。この株の耐性機構を解析したところ、macrolide 排出ポンプをコードする *mef(A)* 遺伝子の獲得であった。また、*mef(A)* 遺伝子の近傍に tetracycline 耐性に関与する *tet(M)* 遺伝子が存在し、これらの遺伝子領域は、*Streptococcus pneumoniae* の Tn916-family transposon 上の配列と高い相同性を示した。従って、同じ上気道に存在する *S. pneumoniae* から水平伝播によって、これらの耐性遺伝子を獲得した多剤耐性 *H. influenzae* が出現したことが強く示唆された。

以上、瀬山氏の論文は、小児領域における抗菌薬の新規導入や適応拡大が、*H. influenzae* の薬剤感受性に影響していることを示した。さらに、これらの薬剤に対する耐性機構は主に関連遺伝子の変異によることを明らかとした。また、外来性遺伝子を獲得した多剤高度耐性株を初めて見出した。

このように、本研究論文は、新規抗菌薬開発の手がかりとなることに加え、抗菌薬の

適正使用において有益な情報を付与し、国際的問題である薬剤耐性 (AMR) 対策にも貢献する臨床薬学において価値あるものである。従って、本論文は、博士 (薬学) の学位論文として相応しいものと判断する。