

インフルエンザ菌の薬剤耐性に関する研究

2017 年度

東京薬科大学大学院薬学研究科

瀬山 翔史

【 目 次 】

序論.....	1
第 1 章: BLNAR の分子疫学解析	
背景.....	7
材料と方法	8
1. 使用菌株	8
2. 培養条件	8
3. PCR 法による P6 及びβ-lactamase 遺伝子の検出と莢膜型の検出	8
4. BLNAR の遺伝学的同定	10
5. 薬剤感受性試験	11
6. Multilocus sequence typing (MLST) 法による遺伝学的特徴の解析	12
7. 統計解析	12
結果.....	13
1. 菌株の特徴と莢膜型	13
2. 変異型 <i>ftsI</i> 保有株の出現.....	14
3. BLNAR に対する各種薬剤感受性.....	17
4. Clarithromycin 耐性株 (MIC ≥32 μg/mL) の遺伝学的特徴	19
考察.....	20
第 2 章: Macrolide 耐性の分子メカニズムの解析	
背景.....	22
材料と方法	24
1. 使用菌株と培養条件	24
2. Macrolide 耐性遺伝子及び変異の検出 [<i>mef</i> (A)、 <i>erm</i> (B)、L4、L22]	24
3. 薬剤感受性試験	24
4. RT-PCR 法による <i>H. influenzae</i> の染色体性多剤排出ポンプ遺伝子の 転写量の解析	26
5. <i>acr</i> オペロンの塩基配列決定	26
6. <i>H. influenzae</i> Rd 株のコンピテントセルの作製.....	26
7. エレクトロポレーション法.....	27
8. AcrB の立体構造予測.....	27
9. 統計解析	27
10. 塩基配列の登録	27
結果.....	28
1. Macrolide 耐性因子の解析 [<i>mef</i> (A)、 <i>erm</i> (B)、L4、L22].....	28

2. 異物排出ポンプ阻害剤の影響.....	28
3. <i>H. influenzae</i> の染色体性多剤排出ポンプ遺伝子の転写量.....	28
4. <i>acr</i> オペロン塩基配列の解析.....	31
5. <i>Acr</i> の CAM 耐性への関与.....	31
6. <i>AcrB</i> 領域の解析.....	35
7. <i>AcrB</i> の 327 番目のアミノ酸置換による AZM 低度耐性化機構の解析.....	35
考察.....	37

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

背景.....	40
材料と方法.....	42
1. 使用菌株と培養条件.....	42
2. 菌種同定と莢膜型の決定.....	42
3. β -lactam 系薬耐性の分類.....	42
4. 薬剤感受性試験.....	42
5. <i>GyrA</i> と <i>ParC</i> の QRDR 領域におけるアミノ酸置換の解析.....	42
6. <i>GyrA</i> のアミノ酸置換 Ser84Leu の簡易検出法.....	43
7. 統計解析.....	43
結果.....	45
1. 菌株の特徴と β -lactam 耐性の分類.....	45
2. <i>H. influenzae</i> の fluoroquinolone に対する感受性.....	45
3. <i>GyrA</i> 及び <i>ParC</i> の QRDR 領域におけるアミノ酸置換の解析.....	48
4. <i>GyrA</i> のアミノ酸置換 Ser84Leu の簡易検出法の構築.....	48
考察.....	50

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

背景.....	52
材料と方法.....	53
1. 使用菌株と培養条件.....	53
2. 菌種の同定と莢膜型の決定.....	53
3. Multilocus sequence typing (MLST) 法による遺伝学的特徴の解析.....	53
4. β -lactam 系薬耐性の分類.....	53
5. 薬剤感受性試験.....	53
6. 各種耐性遺伝子の検出とその解析.....	54
7. <i>mef(A)</i> 遺伝子領域の伝達実験.....	56
8. <i>mef(A)</i> 遺伝子領域の脱落実験.....	56

9. 塩基配列の登録	56
結果.....	57
1. Macrolide 高度耐性 <i>H. influenzae</i> 2014-102 株の特徴.....	57
2. Macrolide 耐性遺伝子の検出とその解析.....	57
3. <i>mef</i> (A) 周辺領域の解析	57
4. <i>mef</i> (A) 遺伝子領域の伝達	61
5. <i>mef</i> (A) 遺伝子領域の脱落	61
考察.....	62
総括.....	64
謝辞.....	66
引用文献	67
研究成果の掲載誌	81

【 略 語 一 覧 】

ABC	ATP binding cassette
ABPC	ampicillin, aminobenzyl penicillin
AMPC	amoxicillin
AMR	Antimicrobial resistance
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenosine triphosphate
AZM	azithromycin
BHI	brain heart infusion
BLNAR	β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant <i>Haemophilus influenzae</i>
BLNAS	β -lactamase-nonproducing ampicillin-susceptible <i>Haemophilus influenzae</i>
BLPACR	β -lactamase-producing amoxicillin/clavulanic acid-resistant <i>Haemophilus influenzae</i>
BLPAR	β -lactamase-producing ampicillin-resistant <i>Haemophilus influenzae</i>
CAM	clarithromycin
CAMHB	cation-adjusted Muller-Hinton broth
CCCP	carbonyl cyanide <i>m</i> -chlorophenylhydrazone
CDTR	cefditoren
CFPN	cefcapene
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CPFX	ciprofloxacin
CTR	ceftriaxone
CTX	cefotaxime
CVA	clavulanic acid
EB	etidium bromide
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> type b
LHB	lysed horse blood
LVFX	levofloxacin
Low-BLNAR	β -lactamase-nonproducing ampicillin-low-resistant <i>Haemophilus influenzae</i>
MAMA-PCR	mismatch amplification mutation assay polymerase chain reaction
MATE	multidrug and toxic compound extrusion
MEPM	meropenem
MF	major facilitator

MFLX	moxifloxacin
MHB	Mueller-Hinton broth
MIC	minimum inhibitory concentration
MINO	minocycline
MLST	multilocus sequence typing
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
NFLX	norfloxacin
NTHi	nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i>
PA β N	phenylalanine-arginine β -naphthylamide
PBP	penicillin binding protein
PCR	polymerase chain reaction
PD	pharmacodynamics
PK	pharmacokinetics
QRDR	quinolone resistance-determining region
RND	resistance nodulation cell-division
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SBT	sulbactam
SMR	small multidrug resistance
ST	sequence type
STFX	sitafloxacin
TBPM	tebipenem
TFLX	tosufloxacin
THB	Todd-Hewitt broth
sBHI broth	brain heart infusion broth with supplements (β -NAD and hemin)

【 序 論 】

Haemophilus influenzae (インフルエンザ菌) は、1892 年にドイツの細菌学者 Pfeiffer によりインフルエンザ患者の喀痰から原因微生物として分離されたことから、命名された¹⁾。その後、1930 年代にインフルエンザの原因が Influenza virus であり、本菌が原因でないことが明らかとなったが、学名は維持されている。本菌は、*Pasteurellaceae* 科 *Haemophilus* 属に分類される通性嫌気性のグラム陰性桿菌である。その大きさは $0.3 \sim 0.5 \mu\text{m} \times 0.5 \sim 1.0 \mu\text{m}$ と他の陰性桿菌と比較し小さいことから短桿菌、球桿菌、または小桿菌などと言われる。また、本菌は多形性を示し、フィラメント状や球菌状の形態もとれる。さらに、*H. influenzae* は血液中に含まれる発育因子として易熱性物質の V 因子 (nicotinamide adenine dinucleotide: NAD) と耐熱性物質の X 因子 (hemin) の両方を必要とする高栄養要求性の細菌である。通常、高栄養要求性細菌の培養には、血液添加培地が用いられるが、加熱前の血液には発育因子である NAD 以外に、易熱性の発育阻害成分も含まれているため²⁾、血液寒天培地には発育せず、その培養には、ウマもしくはウサギの血液を加熱処理したチョコレート寒天培地が用いられる¹⁾。*H. influenzae* は、ヒトの上気道に広く常在し、特に小児の保有率が高いことが知られている³⁾。一方で、本菌は、*Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌) と並び市中における中耳炎、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、肺炎の主要な原因菌である。また、時として敗血症、髄膜炎などの重篤な侵襲性感染症の原因となることが知られている³⁾。*H. influenzae* は、気道分泌物の飛沫、接触感染によって、ヒトからヒトへ伝播する。特に、家庭内や保育園などの接触密度が高い環境において、免疫系の発達が未熟な小児では、容易に伝播することが報告されている⁴⁻⁷⁾。

H. influenzae は、外膜の外側に莢膜を有する株が存在する。莢膜は、多糖体 (ポリサッカライド) からなり、白血球による貪食や補体による溶菌など、免疫反応に抵抗する作用を持つことが知られ、病原性の発現に重要な因子である⁸⁻¹⁴⁾。しかし、莢膜に抗体が結合することで、好中球が活性化され、細菌は貪食される。つまり、莢膜に対する抗体は中和抗体として作用するため、莢膜を有する株による感染症の予防には、ワクチンが使用されている。本菌の莢膜は、構成多糖体の違いにより抗原性が異なっており、本菌は莢膜の有無ならびに抗原性の違いから、無莢膜型 (nontypeable *H. influenzae*: NTHi)、莢膜型 a、b、c、d、e、f の 7 つに分類される¹⁵⁾。これらの中で、莢膜 b 型の *H. influenzae* (*H. influenzae* type b: Hib) は、小児の化膿性髄膜炎や敗血症などの侵襲性感染症と強く関連していることが明らかになっている¹⁶⁻¹⁸⁾。そのため、小児の Hib 関連侵襲性感染症予防を目的とし、b 型莢膜多糖体を用いたワクチン (Hib ワクチン) が活用可能である。本邦でも 2008 年 12 月より、Hib 莢膜多糖体蛋白結合ワクチン (アクトヒブ®) が任意接種化され、2013 年 4 月より予防接種法による定期接種の対象となった¹⁹⁾。Hib ワクチンの導入を行った国では、Hib による侵襲性感染症の患者数は激減している²⁰⁾。一方、Hib 以外の莢膜型と無莢膜型 (NTHi) による侵襲

性疾患の増加が報告されている²¹⁻²⁴⁾。気道感染症においても、現在では、b 型株は極めてまれであり、その原因のほとんどが NTHi によるものである²⁵⁾。NTHi の病原性因子として、細胞付着性因子やバイオフィーム産生能などが考えられているが、疾患を引き起こす機序については、明らかとなっていない²⁶⁻²⁸⁾。従って、NTHi 感染症に対する病原性や治療薬に対する感受性の動向などの疫学が注目されている。

疫学解析のための *H. influenzae* の分類法として、上述した莢膜型に加え、生化学的性状に基づく生物型や、遺伝学的性状に基づく multilocus sequence typing (MLST) が使用されている。生物型は、3 つの生化学的性状であるインドール産生能、ウレアーゼ産生能とオルニチン脱炭酸能の活性の違いを利用した方法であり、これにより I ~ VIII の生物型に分類される^{29,30)}。侵襲性感染症から分離された Hib の多くは I 型であり、無莢膜型は主に II、III 型に属している³⁾。しかし、臨床分離株の多くは I、II、III、IV 型に分類され、生物型にバリエーションが認められるため、詳細な疫学解析には不向きである。一方、MLST は、近年様々な細菌の疫学解析で用いられ、菌株間で異なる遺伝学的特徴を利用した分子疫学解析法である^{31,32)}。*H. influenzae* の MLST では、生存に必須とされる 7 つの housekeeping gene (*adh*, *atpG*, *frdB*, *fucK*, *mdh*, *pgi*, *recA*) の塩基配列を解析し、各遺伝子の多型に基づき型別を行う³¹⁻³³⁾。これらの塩基配列の多型は、ウェブ上 (<http://www.mlst.net/>) でデータベース化されており、それぞれの allele 番号が規定されている。この組み合わせにより sequence type (ST) が決定される。この手法では、得られた臨床分離株の遺伝学的背景を国内外の様々なサーベイランスの菌株の ST と比較することができる。これまでに、Hib は比較的同一あるいは類似した遺伝学的背景を有するのに対し、NTHi の ST は、極めて多様性を示すことが明らかになっている (Fig. 1)^{34,35)}。

H. influenzae による感染症の治療には、主に β -lactam 系である penicillin 系薬の ampicillin (ABPC) や cephem 系薬などが使用されている^{36,37)}。 β -lactam 系薬は、細胞壁合成酵素であるペニシリン結合タンパク (penicillin binding protein: PBP) に作用し、ペプチド架橋反応を阻害することで抗菌作用を示す。しかしながら、 β -lactam 系薬に対する耐性菌がすでに出現しており、その増加が臨床上大きな問題となっている^{38,39)}。*H. influenzae* は、 β -lactam 系薬の感受性結果から 5 つに分類される (Table 1)。

これらの β -lactam 系薬耐性は、大きく 2 つの機序に起因する。第 1 は、 β -lactam 系薬を分解する β -lactamase 産生によるものであり、 β -lactamase 産生 ABPC 耐性株 (BLPAR: β -lactamase-producing ABPC resistant *H. influenzae*) は、1970 年代の中ごろから分離され始めた⁴⁰⁾。BLPAR は、*H. influenzae* による髄膜炎の治療において、毒性が少なく治療効果が高いとされた ABPC を分解するため、大きな問題となった^{41,42)}。BLPAR が産生する β -lactamase は、Amber の分類による class A β -lactamase であり、TEM 型と ROB 型が知られている⁴³⁾。このうち、TEM 型が 9 割を占めている。これは、主に penicillin 系薬をよく加水分解するが、cephalosporin 系薬や carbapenem 系薬などは加水分解されにくい⁴⁴⁾。また、class A β -lactamase は、clavulanic acid などの β -

lactamase 阻害剤の添加により、その活性を阻害することができるため、BLPAR の治療には、cephalosporin 系薬やβ-lactamase 阻害剤配合 penicilline 系薬が使用できる。

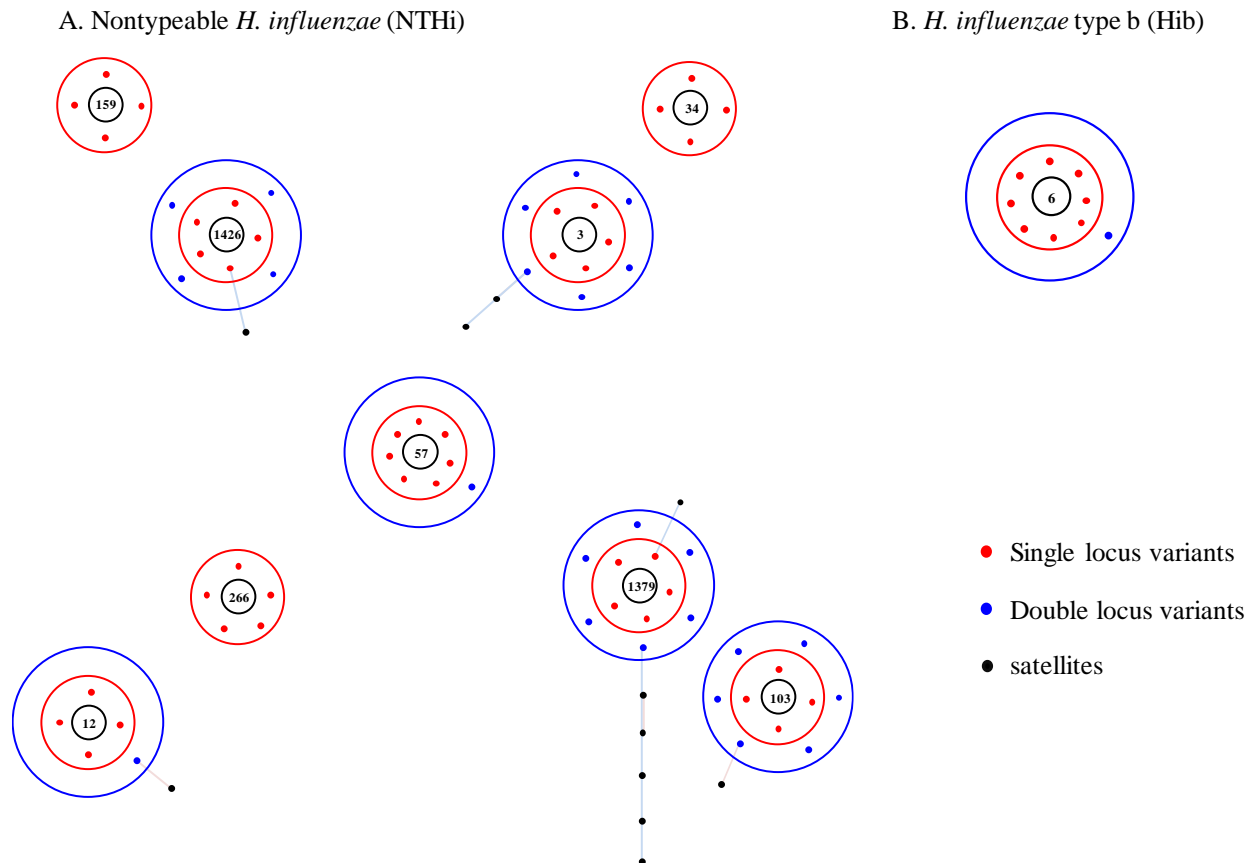


Fig. 1. Geneic diversity of *Haemophilus influenzae* by MLST analysis.

Black circle, founding sequence type; red circle, single locus variant; blue circle, double locus variants; line, line shows genetic distance.

This figure was drawn by eBURST on the MLST website and based on the data of all isolates which have been deposited on the website after 2010.

第2は、β-lactam 系薬の作用標的である penicillin binding protein 3 (PBP3) をコードする *ftsI* 遺伝子上にアミノ酸置換を伴う変異が生じ、PBP3 に対する薬剤親和性が低下することにより、耐性を示すものである^{38,45)}。*H. influenzae* の PBP は7種類知られているが、主に PBP3 の変異が耐性に関与している。β-lactamase を産生せず、PBP3 のアミノ酸置換で耐性を示す株は、β-lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *H.*

influenzae (BLNAR) と呼ばれ、2000 年代からアジアやヨーロッパを中心に増加している^{46,47)}。BLNAR では、penicillin 系薬に対する感受性が低下することに加え、PBP3 との親和性が高い cephem 系薬に対しても感受性が明らかに低下する^{38,48)}。

Table 1. Classification of ABPC-resistant class in *H. influenzae* based on MIC of β -lactams

Resistance class	β -lactamase	MIC (μ g/mL) of antibiotic agents	
		ABPC	AMPC/CVA
BLNAS	-	≤ 1	/
BLNAI	-	2	/
BLNAR	-	≥ 4	/
BLPAR	+	/	<8
BLPACR	+	/	≥ 8

MIC, minimum inhibitory concentration; ABPC, ampicillin; AMPC/CVA, amoxicillin/clavulanic acid; /, not defined; +, positive; -, negative; BLNAS, β -lactamase-nonproducing ABPC-susceptible *H. influenzae*; BLNAI, β -lactamase-nonproducing ABPC-intermediate *H. influenzae*; BLNAR, β -lactamase-nonproducing ABPC-resistant *H. influenzae*; BLPAR, β -lactamase-producing ABPC-resistant *H. influenzae*; BLPACR, β -lactamase-producing AMPC/CVA-resistant *H. influenzae*

PBP3 に対する ABPC の親和性がアミノ酸置換により低下することは、1984 年に Parr らによって報告された⁴⁹⁾。その後、生方らによって、PBP3 のアミノ酸置換を伴い、 β -lactam 系薬の感受性低下に影響を与える *ftsI* 遺伝子の変異箇所が複数存在することが報告された³⁸⁾。BLNAR における PBP3 のアミノ酸置換は、385 番目の serine から threonine への置換 (S385T)、517 番目の arginine から histidine への置換 (R517H)、526 番目の asparagine から lysine への置換 (N526K) の 3 カ所が特に重要であることが明らかにされている^{38,45,50)}。また、各アミノ酸置換部位や置換数と抗菌薬感受性には相関があることが知られており、遺伝子の保有と PBP3 中の変異の有無による遺伝学的分類法も提唱されている (Table 2)。この遺伝子に基づいた分類法では、genotype の g が付記されている。gBLNAR のうち、R517H あるいは N526K へのいずれか単一の変異を有している株は、耐性度がやや低いことが示されている^{38,46)}。一方、S385T と R517H あるいは S385T と N526K の 2 カ所のアミノ酸置換を有する株は、耐性度が明らかに上昇することが示されている⁴⁸⁾。また、近年では、*ftsI* 遺伝子変異と β -lactamase 産生能を有する耐性株が分離され始めている^{51,52)}。これらは、 β -lactamase-producing amoxicillin/clavulanic acid-resistant *H. influenzae* (BLPACR) と呼ばれている (Table 1)。BLPACR も PBP3 のアミノ酸置換の数から、gBLPACR-I と gBLPACR-II に分けられている (Table 2)。

Table 2. Classification of ABPC resistant class in *H. influenzae* based on β -lactams resistant associated genes

Resistance class	β -lactamase gene	Amino acid substitution in PBP3		MIC of ABPC (μ g/mL)
		R517H or N526K	S385T and R517H or N526K	
gBLNAS	-	-	-	≤ 1
gBLPAR	+	-	-	≥ 64
gLow-BLNAR	-	+	-	2 - 16
gBLNAR	-	-	+	2 - 32
gBLPACR-I	+	+	-	≥ 64
gBLPACR-II	+	-	+	≥ 64

MIC, minimum inhibitory concentration; +, positive; -, negative; ABPC, ampicillin; BLNAS, β -lactamase-nonproducing ABPC-susceptible *H. influenzae*; BLPAR, β -lactamase-producing ABPC-resistant *H. influenzae*; BLNAR, β -lactamase-nonproducing ABPC-resistant *H. influenzae*; BLPACR, β -lactamase-producing amoxicillin/clavulanic acid-resistant *H. influenzae*

本邦では、臨床で分離される *H. influenzae* の約 50%が ampicillin (ABPC) 耐性菌とされている³⁹⁾。そのうち BLPAR の分離頻度は 5 ~ 10%であり、流行の拡大は認められていない⁵³⁾。一方、BLNAR は、ABPC 耐性菌の中で 75%以上と圧倒的に多く、小児科領域において疾患の難治例や反復例に起因するため、临床上大きな問題となっている⁵⁴⁾。このように、本菌の β -lactam 系薬の耐性機序は様々であり極めて複雑であるため、その分離状況や薬剤感受性の動向について継続的に注視する必要がある。

β -lactam 系薬以外の治療薬としては、多くの菌株が感受性を示す macrolide 系薬や fluoroquinolone 系薬がある。Macrolide 系薬は、細菌のリボソーム 50S サブユニットの構成成分である 23S rRNA のドメイン V の特定のアデニンに結合し、アミノアシル tRNA の転移を阻害することで、タンパク質の合成を阻害する。一方、fluoroquinolone 系薬は、細菌の DNA 複製に必須な酵素である DNA ジャイレースやトポイソメラーゼ IV に作用し、DNA の複製を阻害する。これらの薬剤は、抗菌スペクトルが広く、組織移行性も良好であるため、呼吸器感染症などに対するエンピリック治療に繁用されやすい。しかし、これらの薬剤の使用頻度が高い成人患者から分離される呼吸器感染症の起炎菌において、これらの薬剤に対する耐性株や感受性が低い株 (低感受性株) の出現も報告されている^{42, 55)}。*H. influenzae* においても同様である。しかし、本邦の小児科領域で分離される *H. influenzae* において、これらの薬剤に対する低感受性株の分離例は報告されていない。近年、本邦では、BLNAR などの耐性菌による難治性中耳炎や呼吸器感染症の治療薬として carbapenem 系薬である tebipenem や macrolide 系薬である azithromycin (AZM)、fluoroquinolone 系薬である tosufloxacin の小児適応が承認された (Fig. 2)。従って、新規抗菌薬の導入や適応の拡大に伴い、抗菌薬の使用法

及び使用量がこの数年で大きく変化している。これは、起炎菌のみならず、常在性の本菌も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。

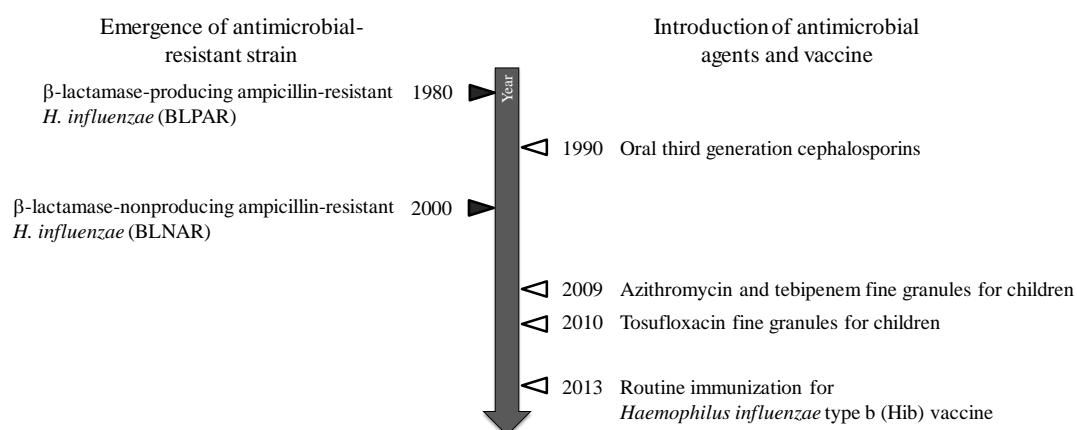


Fig. 2. Timeline of emergence of antimicrobial resistance strain and introduction of agents and vaccine in pediatric field

そこで、本研究では、種々の抗菌薬導入に伴う *H. influenzae* の各種薬剤感受性へ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、この疫学解析において見出された *H. influenzae* の耐性株ならびに感受性低下株についてそのメカニズムを詳細に解析した。

第1章では、BLNARにおける β -lactam系薬や他の薬剤に対する耐性化の現状ならびに傾向を明らかにし、臨床における抗菌薬選択の指針とするため、各種薬剤感受性の調査や分子レベルの疫学解析を行った。第2章では、疫学解析により見出された clarithromycin (CAM) 耐性 BLNAR 株と AZM 低度耐性 BLNAR 株の macrolide 耐性メカニズムについて検討した。第3章では、小児科領域における TFLX 導入後の小児由来 *H. influenzae* における各種 fluoroquinolone 系薬の薬剤感受性の動向及び fluoroquinolone 標的遺伝子の解析をした。また、fluoroquinolone 系薬低感受性株の簡易検出法を開発した。第4章では、世界的にも分離例のない多剤耐性トランスポゾンを獲得したと考えられる *H. influenzae* を分離し、その耐性機構と遺伝学的特徴について解析を行った。

第 1 章

BLNAR の分子疫学解析

【 背 景 】

Haemophilus influenzae による感染症の治療には、主に β -lactam 系薬が使用されている。しかし、近年、市中感染症において、 β -lactam 系薬に耐性を示す株の出現が問題となっている^{54, 56, 57)}。特に、小児科領域では、治療薬の選択肢が限られるため、 β -lactam 系薬の重要度は高く、 β -lactam 系薬耐性株の増加は難治例や反復例の増加に繋がることが懸念される。臨床で分離される β -lactam 系薬耐性株の主な耐性メカニズムは、薬剤の分解酵素である β -lactamase の産生または、 β -lactam 系薬の作用標的である penicillin binding protein 3 (PBP3) の変異である。

β -lactam 系薬耐性株は、薬剤感受性試験の結果 (Table 1) もしくは、PBP3 をコードする *ftsI* 遺伝子解析の結果から分類される (Table 2)^{39, 58)}。このうち、本邦では、PBP3 に変異を有する β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *H. influenzae* (BLNAR) が多く分離されている。*ftsI* 遺伝子には多様性が認められ、BLNAR は、極めて複雑な耐性パターンを示す³⁸⁾。多様性の原因として、*H. influenzae* の持つ自然形質転換能による *ftsI* 遺伝子の水平伝播が報告されている⁵⁹⁻⁶¹⁾。従って、今後も外来遺伝子を獲得し、新規の PBP3 をもつ新たな耐性株が出現する可能性がある。

β -lactam 系薬耐性株には、macrolide 系薬や fluoroquinolone 系薬が代替薬となり得るが、成人由来の株では、低感受性株の出現も報告されている^{42, 55)}。また、近年、小児領域において、新規抗菌薬が導入されており、導入後の抗菌薬感受性の変化が注目されている。

そこで、本章では、臨床分離 BLNAR 株の示す β -lactam 耐性パターンと抗菌薬感受性の動向を明らかにするため、2007 年から 2012 年に大学病院で分離された BLNAR の各種抗菌薬感受性の変化を検討した。BLNAR の解析は、遺伝子変異と β -lactam 系薬耐性の関連を詳細に解析するため、*ftsI* 遺伝子の塩基配列に基づく遺伝学的分類を行った。また、菌株の特徴について MLST 法を用いて解析を行った。

【 材 料 と 方 法 】

1. 使用菌株

使用菌株は、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、患者より分離され、BLNAR と判定された 304 株を使用した。BLNAR は、Cefinase™ disk (Becton Dickinson) ならびに MicroScan™ WalkAway™ System (Siemens) により判定され、 β -lactamase 非産生かつ ampicillin 耐性を示した株である。菌株の内訳は、2007 年が 55 株、2008 年が 53 株、2009 年が 41 株、2010 年が 68 株、2011 年が 53 株、2012 年が 34 株であった。また、薬剤感受性試験の標準株として *H. influenzae* ATCC49247 株と ATCC49766 株を用いた。これらの株は、15% glycerol 含有 BHI broth (Oxoid) 中に濃厚に懸濁し、使用時まで-80°C で保存した。

2. 培養条件

菌株は、AnaeroPack®-MicroAero (Mitsubishi gas chemical) を使用した微好気条件下、チョコレート寒天培地上で 37°C、18 ~ 24 hr で培養した。チョコレート寒天培地は後述のように作成した。まず、5% defibrinated horse blood (Nippon Bio-Test Laboratories) 及び 5 mg/mL Bactro™ Yeast Extract (Becton Dickinson) 含有 brain heart infusion agar (BHI: Oxoid) を 75 ~ 80°C の湯浴で 20 min 攪拌した。次いで、40°C 程度に冷却した後、 β -nicotinamide-adenine dinucleotide oxidized form (β -NAD: Wako) を 15 μ g/mL となるように加えた。

3. PCR 法による P6 及び β -lactamase 遺伝子の検出と莢膜型の検出

3-1. PCR 法

PCR 試料は、*H. influenzae* のシングルコロニーを滅菌超純水 100 μ l に懸濁後、95°C で 5 min の加熱処理を行った菌液を用いた。8 連 PCR チューブ (Bio-Bik) に GoTaq®Green Master Mix (Promega) 5 μ L、各種合成プライマー (Table 3) を各々 10 pmol、PCR 試料 1 μ L を加え、滅菌ろ過超純水にて全量を 10 μ L とした。これらを混合した後、DNA サーマルサイクラーにセットした。*omp P6*、*bla*_{TEM-1} と *bla*_{ROB-1} の検出は、95°C、2 min の加熱後、95°C、15 sec の変性、55°C、15 sec のアニーリング、72°C、30 sec の伸長反応の行程を 25 サイクル行った⁶²⁻⁶⁴⁾。莢膜型の決定は、95°C、2 min の加熱後、95°C、15 sec の変性、53°C、15 sec のアニーリング、72°C、30 sec の伸長反応の行程を 25 サイクル行った⁶⁵⁾。DNA 増幅バンドの確認は後述するアガロースゲル電気泳動法により行った。プライマーの合成は、Sigma-Aldrich または北海道システムサイエンスに依頼した。

Table 3. Oligonucleotide primers and probes used in this study

Target gene	Primer and Probe	Sequence (5' to 3')	Amplicon length (bp)	Reference
<i>ompP6</i>	P6-F P6-R	TGGCGGATACTCTGTTGCT GCGCATCTAAGATTTGAACG	143	62
<i>bla_{TEM-1}</i>	TEM-1-F TEM-1-R	TTGCCGGGAAGCTAGAGTAA CGCCGCATACACTATTCTCA	302	63
<i>bla_{ROB-1}</i>	ROB-1-F ROB-1-R	CTAATCCGCAGCCTGCTAGT ACAACGCCTTGAAAAGTGGAC	192	64
<i>bexA</i>	HI-F HI-R	CGTTTGTATGATGTTGATCCAGAC TGTCCATGTCTTCAAAATGATG	343	65
<i>ftsI</i>	Asn526Lys-F Asn526Lys-R	TAAACGCGCTATGGTGGAAG CACTAATGCATAACGAGGGTC	142	66
<i>ftsI</i>	Asn526Lys-P Ser385Thr-F Ser385Thr-R Ser385Thr-P	5' - (FAM ^a) -AAGAAATATGTGG- (Eclipse ^b) -3' AAATTGTGGACGTTGCACCT AGCGTTTACGTTTGCCTTC 5' - (FAM ^a) -TGGTGTGACTC- (Eclipse ^b) -3'	204	66
<i>ftsI</i>	ftsI up2 ftsI down2	TTACAAGTGCAGGAAGCTAC TCCATTGGTGTGAACCTAC	2776	this study
<i>adk</i>	adk-up adk-dn	GGTGCACCGGGTGCAGGTAA CCTAAAGATTTTATCTAACTC	477	33
<i>atpG</i>	atpG-up atpG-dn	CCTAAAGATTTTATCTAACTC TTGTACAACAGGCTTTTGCG	477	33
<i>frdB</i>	frdB-up frdB-dn	CTTATCGTTGGTCTTGCCGT TTGGCACTTTCACCTTTTCC	489	33
<i>fucK</i>	fucK-up fucK-dn	ACCACTTTCGGCGTGGATGG AAGATTTCCCAGGTGCCAGA	345	33
<i>mdh</i>	mdh-up mdh-dn	TCATTGTATGATATTGCCCC ACTTCTGTACCTGCATTTTG	405	33
<i>pgi</i>	pgi-up pgi-dn	GGTGA AAAAATCAATCGTAC ATTGAAAGACCAATAGCTGA	468	33
<i>recA</i>	recA-up recA-dn	ATGGCAACTCAAGAAGAAAA TTACCAAACATCACGCCTAT	426	33

F or up, forward primer; R or dn, reverse primer; P, probe; ^a, Fluorescent molecules: carboxyfluorescein (FAM) ;

^b, Quenching molecules

3-2. アガロースゲル電気泳動法

PCR 反応液 2 μ L を用いて電気泳動用サンプルとした。TAE buffer [40 mM Tris-acetate (pH8.2)、2 mM EDTA 2Na] を用い、2% agarose S (Nippon Gene) ゲルにて、100 V で 30 min の電気泳動を行った。電気泳動装置は、水平サブマリン型電気泳動槽 i-Mupid (Cosmo Bio) を使用した。泳動後、100 μ g/mL etidium bromide (Wako) 溶液でゲルを 30 min 染色し、水洗後、305 nm の紫外線照射下で蛍光を発した DNA を写真撮影した。DNA 断片の分子量は、分子量既知の 100 bp DNA ladder (Takara Bio) と泳動距離を比較することで求めた。

4. BLNAR の遺伝学的同定

4-1. Real-time PCR 法による S385T と N526K の検出

PBP3 上のアミノ酸置換 S385T と N526K の検出は、Kishii らの real-time PCR 法を一部改変して行った⁶⁶⁾。Real-time PCR 用試料は、*H. influenzae* のシングルコロニーを滅菌超純水 100 μ L に懸濁後、95°C で 5 min の加熱処理を行った菌液を用いた。MicroAmpTM Fast Optical 48-well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific) に THUNDER-BIRDTM probe qPCR Mix (Toyobo) 10 μ L、2 種類の合成プライマー (Table 3) を各 6 pmol、Probe (Table 3) 4 pmol、50 \times ROX reference dye 0.4 μ L、real-time PCR 試料 1 μ L を加えて、滅菌ろ過超純水を用い 20 μ L とした。混合後、Thermo Fisher Scientific StepOneTM Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific) にセットした。S385T は、95°C、5 min の初期変性、95°C、15 sec の変性、53°C、30 sec のアニーリング、72°C、20 sec の伸長反応の行程を 40 サイクル行った。N526K は、95°C、5 min の初期変性、95°C、15 sec の変性、44°C、30 sec のアニーリング、72°C、20 sec の伸長反応の行程を 40 サイクル行った。Data Collection は、アニーリングステップに設定した。

4-2. R517H 領域及び変異型 *ftsI* 遺伝子産物の増幅

PCR 試料は、上述した方法と同様に調製し、PCR を行った。PBP3 上のアミノ酸置換 R517H の検出は、N526K のプライマーセット (Table 3) を用いて DNA を増幅させた。PCR 条件は、94°C、5 min の初期変性、94°C、20 sec の変性、55°C、20 sec のアニーリング、72°C、30 sec の伸長反応の行程を 30 サイクル行った。変異型 *ftsI* 遺伝子保有株の解析は、ftsI up2 と S385T-R、ftsI down2 と S385T-F のプライマー (Table 3) の組み合わせを用いて DNA を増幅させた。PCR 条件は、95°C、2 min の初期変性、95°C、30 sec の変性、50°C、30 sec のアニーリング、72°C、2 min の伸長反応の行程を 30 サイクル行った。

4-3. PCR 産物の精製

PCR 産物は、illustraTM ExoProStarTM (GEHealth care) を用いて精製した。PCR 産物 10 μ L に alkaline phosphatase 1 μ L と exonuclease 1 μ L を加えて、37°C、15 min、その後、80°C、15 min で処理したものを PCR 精製物とした。

4-4. シーケンス反応

ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1 Cycle sequence Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、ジデオキシターミネーター法によりシーケンス反応を行った。8 連 PCR チューブに Ready reaction premix 1 μ L、5 \times sequencing buffer 1.5 μ L、プライマー 1.6 pmol、PCR 精製物 20-50 ng を加え、滅菌超純水にて全量を 10 μ L となるように混合した。これらを DNA サーマルサイクラーにセットした。96°C、5 min の初期変性、96°C、10 sec の変性、50°C、5 sec のアニーリング、60°C、4 min の伸長反応の行程を 25 サイクル行

った。反応液をマイクロ遠心チューブに移し、125 mM EDTA 2.5 μ L、100% ethanol 30 μ L を加え、よく混合した後、15 min 放置した。その後、遠心分離 (4°C、15,000 rpm、15 min) し、上清を捨てた。70% ethanol 30 μ L を加え、遠心分離 (4°C、15,000 rpm、10 min) し、上清を捨てた。真空乾燥により ethanol を完全に除去した後、ペレットを Hi-Di™ formamide (Thermo Fisher Scientific) 20 μ L に溶解し、電気泳動試料とした。

4-5. マルチキャピラリー電気泳動

キャピラリー電気泳動には、オートシーケンサーABI PRISM™ 3130 DNA Sequencer (Thermo Fisher Scientific) を用いた。10 \times genetic analyzer buffer with EDTA (Thermo Fisher Scientific) を超純水で 10 倍希釈し、陽極バッファリーザーバー及び陰極バッファリーザーバーとし、ポンプブロック及びオートサンプラーにそれぞれセットした。泳動用試料を MicroAmp™ optical 96-well reaction plate (Thermo Fisher Scientific) に移して電気泳動を行い、塩基配列を決定した。

4-6. 塩基配列の解析

得られた塩基配列をもとに、GENETYX Ver. 10 (GENETYX) を用いて解析を行った。

4-7. 分子系統樹の作成

分子系統樹は、Clustal W v.1.83 を用いて作成したマルチプルアライメントをもとに GENETYX Ver. 10 (GENETYX) で作成した。作成には、近隣結合法を用いた。

5. 薬剤感受性試験

5-1. 使用薬剤

薬剤感受性の測定には、抗菌薬として amoxicillin (AMPC: Sigma-Aldrich Japan)、clavulanic acid (CVA: Wako)、ampicillin (ABPC: Wako)、ceftriaxone (CTRX: Chugai Pharmaceutical)、cefotaxime (CTX: Wako)、cefcape (CFPN: Shionogi)、cefditoren (CDTR: Meiji Seika Pharma)、meropenem (MEPM: Dainippon Sumitomo Pharma)、tebipenem (TBPM: Meiji Seika Pharma)、azithromycin (AZM: LKT Laboratories)、clarithromycin (CAM: Tokyo Chemical Industry)、levofloxacin (LVFX: LKT Laboratories)、tosufloxacin (TFLX: Wako) を使用した。Amoxicillin-clavulanic acid (AMPC/CVA) は 2:1 の混合比で試験した。

5-2. 薬剤感受性試験

薬剤感受性は、Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) に基づき微量液体希釈法で測定した。薬剤感受性の指標として、最小発育阻止濃度 minimum inhibitory concentration (MIC) を用いた。Defibrinated horse blood を完全に溶血するまで凍結融解を繰り返し、15,000 \times g で 20 min 遠心し、上清を lysed horse blood (LHB) とした。この LHB を Mueller-Hinton broth (MHB: Oxoid) に Ca^{2+} が 20 $\mu\text{g/mL}$ 、 Mg^{2+} が 10 $\mu\text{g/mL}$ と

なるように添加した cation-adjusted Muller-Hinton broth (CAMHB) に、最終濃度が 2.5% となるように加えた。さらに、 β -NAD を 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう CAMHB に添加して測定用培地とした。次いで、チョコレート寒天培地で 37°C、24 hr、微好気条件下で培養した菌を MHB に McFarland standard (bioMérieux) 0.5 と同様の濃さになるように懸濁調製し、薬剤を含有した測定用培地 100 μL に菌液 1 μL を MIC ミニ (Medi Science) を用いて接種した。37°C、21 ~ 24 hr の好気培養後、菌の発育を判定し、各抗菌薬の MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を判定した。各種抗菌薬の感受性の判定基準は、CLSI の breakpoint に準じた (Table 4) ⁶⁷⁾。CLSI に基準値が掲載されていない CFPN、CDTR、TBPM、TFLX は、breakpoint を設定しなかった。また、CLSI による感受性の判定基準より、CAM の MIC が 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の株を CAM 低度耐性株、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の株を CAM 耐性株と定義した ⁶⁷⁾。

Table 4. Susceptibility breakpoint of antimicrobial agents used in this study

Antimicrobial agent	Breakpoint ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Antimicrobial agent	Breakpoint ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
AMPC/CVA	$\leq 4/2$	MEPM	≤ 0.5
ABPC	≤ 1	TBPM	- *
CTR	≤ 2	AZM	≤ 4
CTX	≤ 2	CAM	≤ 8
CFPN	- *	LVFX	≤ 2
CDTR	- *	TFLX	- *

* Breakpoints were not defined in this study

6. Multilocus sequence typing (MLST) 法による遺伝学的特徴の解析

MLST 法は、菌株ごとに 7 つの housekeeping 遺伝子 (*adk*、*atpG*、*frdB*、*fucK*、*mdh*、*pgi*、*recA*) について、Emma らの報告に基づいて解析を行った ³³⁾。DNA の増幅は、Table 3 のプライマーを用いて行った。PCR 条件は、95°C、4 min の初期変性、95°C、30 sec の変性、55°C、1 min のアニーリング、72°C、1 min の伸長反応の行程を 25 サイクル行った。DNA 塩基配列の解析は、上述したシーケンス反応と同様に行った。得られた塩基配列を基に、MLST. Net (<http://www.mlst.net>) より、sequence type (ST) を決定した。

7. 統計解析

統計学的解析は、JMP software (SAS Institute) を用いて、 χ^2 検定により検定し、 $P < 0.05$ のときに統計学的に有意とした。

【 結 果 】

1. 菌株の特徴と莢膜型

本研究で使用した BLNAR の由来は、小児科が 88.8% (n=270)、その他の科が 11.2% (n=34) であった (Fig. 3)。検体採取部位は、鼻腔内 85.2% (n=259) が最も多く、次いで、喀痰 8.2% (n=25)、咽頭・扁桃 4.9% (n=15)、気管支洗浄液 0.7% (n=2)、その他が 1.0% (n=3) であった (Fig. 3)。また、莢膜型は全ての株が無莢膜型であった。

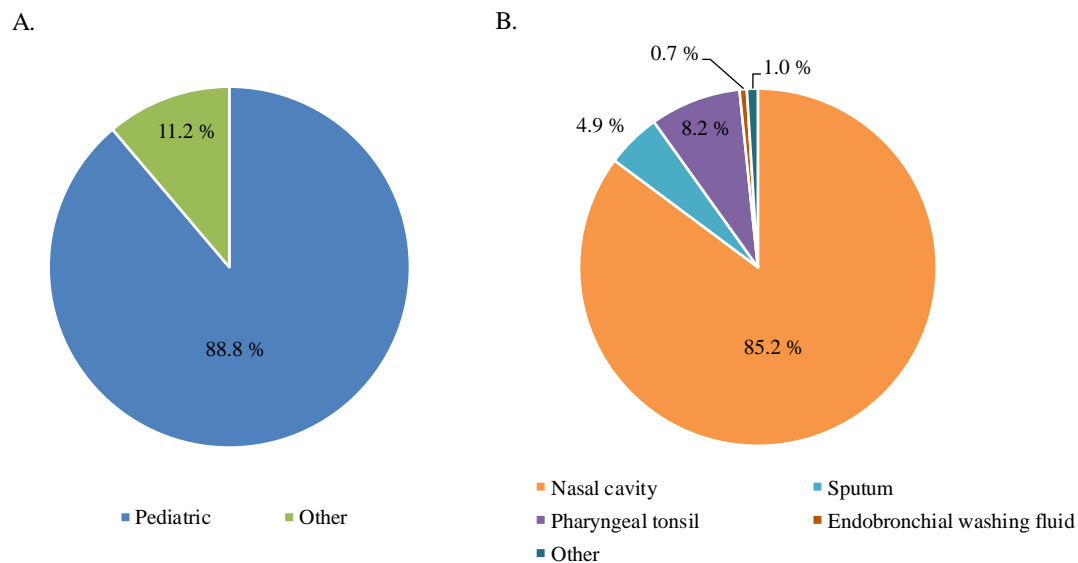


Fig. 3. Isolation department and specimen of BLNAR *H. influenzae* isolates used in this study (n = 304)

A, Clinical department; others include Emergency and Disaster Medicine, Pulmonology, digestive surgery, no information; B, Specimen; other indicates no information.

β -lactam 系薬耐性に関わる PBP3 上の遺伝子変異をシーケンス法と Real-time PCR 法で検出した (Fig. 4)。BLNAR のアミノ酸置換部位は、2007 年から 2009 年では、N526K または R517H を有する株 (class I) が 10.7% (n=16)、S385T 及び R517H を有する株 (class II) が 8.1% (n=12)、N526K 及び S385T を有する株 (class III) が 81.2% (n=121) であった。2010 年から 2012 年では、class I が 5.8% (n=9)、class II が 11.0% (n=17)、class III が 81.9% (n=127) であった。*ftsI* 遺伝子上に既知のアミノ酸置換が認められない株 (non-classified type) が 1.3% (n=2) 認められた。

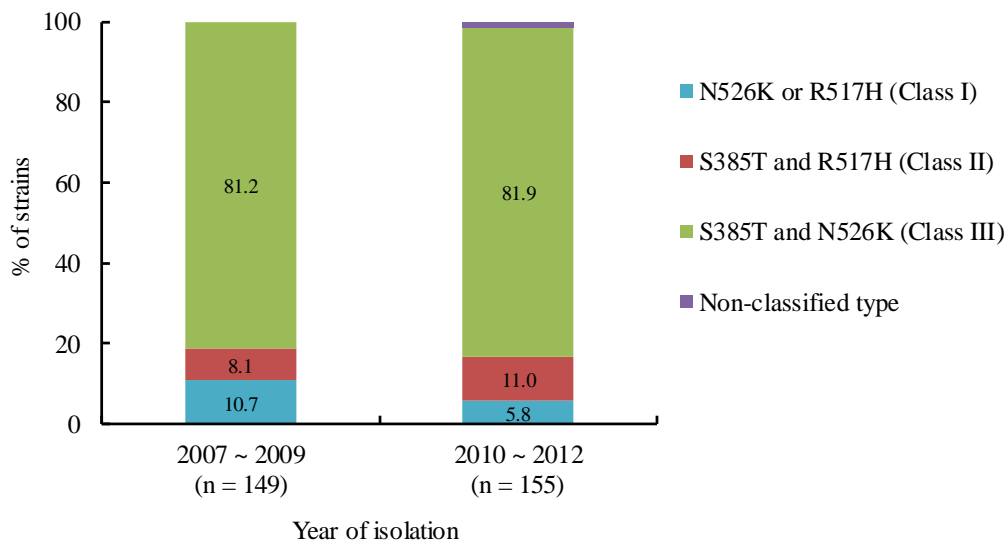


Fig. 4. Comparison of PBP3 amino acid substitutions among BLNAR *H. influenzae* between 2007 ~ 2009 and 2010 ~ 2012

2. 変異型 *ftsI* 保有株の出現

ftsI 遺伝子上に既知のアミノ酸置換が認められなかった株 (2011-92 株と 2011-118 株) の耐性メカニズムを明らかにするために、*ftsI* 遺伝子の塩基配列を解析した。その結果、2011-92 株と 2011-118 株の *ftsI* 遺伝子の塩基配列は同一であることが明らかとなった。すでにゲノム情報が開示されている *H. influenzae* Rd 株の塩基配列とマルチプルアライメントを行ったところ、89.3%の相同性が認められた (Fig. 5A)。 *ftsI* 遺伝子の塩基配列のトランスグリコシダーゼ領域 (nucleotides 840 ~ 1713) は、126 bp (14.4%) の違いが認められた。特に 1521 bp から 1833 bp までの塩基配列では大きく塩基配列が異なり、153 bp (48.9%) の違いが認められた (Fig. 5A)。 *Haemophilus* 属菌の *ftsI* 遺伝子全長をもとに分子系統樹を作成したところ、この株の *ftsI* は独立したクラスターに属していた (Fig. 5B)。

Rd 1 ATGGTGAAATTTAAATTCCTCGCGTAAATCAGGTAAGTCGAAAAAAACAATTAGAAAAATTGACCGCACCTGAAACTGTAAAG 80
 * 1 ATGGTGAAATTTAAATTCCTCGCGTAAATCAGGTAAGTCGAAAAAAACAATTAGAAAAATTGACCGCACCTGAAACTGTAAAG 80

Rd 81 GCAAAAACAAGCCTCTAAAAGCTGTTTGA AAAAATGCTTTATGCGTGGACGTTATATGCTTTCTACG GTTCTTATTTTACTTG 160
 * 81 GCAAAAACAAGCCTCTAAAAGCTGTTTGA AAAAATGCTTTATGCGTGGACGTTATATGCTTTCTACG GTTCTTATTTTACTTG 160

Rd 161 GCTCTGCTGCTCTTATGTCGCAAGAGCACTTATGTTCAATCTATTAATGCGGATACGTTATCGAATGAAGCGGATAAGCGT 240
 * 161 GTCTGCGGCTCTTATGTCGCGAGAGCGCTTATGTTCAATCTATTAATGCGGATACGTTATCGAATGAAGCGGATAAGCGT 240

Rd 241 TCTTTGCGTAAAGATGAAGTATTATCGTGGTGGTCTATTTTAGATCGTAATGGTCAGCTTTTATCTGTAAAGCGTGCC 320
 * 241 TCTTTGCGTAAAGATGAAGTATTATCGTGGTGGTCTATTTTAGATCGTAATGGTCAGCTTTTATCTGTAAAGCGTGCC 320

Rd 321 SATGAGCGCGATTGTGGCAGATCCAAAAACGATGTTGAAGGAAAAATTCGCTTGGCGATAAAGAACGAATTGCAGCTTTAG 400
 * 321 SATGAGCGCGATTGTGGCAGATCCAAAAACGATGTTGAAGGAAAAATTCGCTTGGCGATAAAGAACGAATTGCAGCTTTAG 400

Rd 401 CCGAAGAATTAGGTATGACTGAAAATGATTTAGTAAAAAAATTGAGAAAAATTCATAATCTGGTTATTTGTATTTAGCA 480
 * 401 CCGAAGAATTAGGTATGACTGAAAATGATTTAGTAAAAAAATTGAGAAAAATTCATAATCTGGTTATTTGTATTTAGCA 480

Rd 481 CGTCAAGTTGAATTAAGTAAAGCTTAACATATATTCGTAGATTAAAAAATTAAGGGTATTATTTTAGAAACAGAGCATCGCCG 560
 * 481 CGTCAAGTTGAATTAAGTAAAGCTTAACATATATTCGTAGATTAAAAAATTAAGGGTATTATTTTAGAAACAGAGCATCGCCG 560

Rd 561 TTTTATCCTCGTG TAGAAGAAGCTGCACACGTTGGTGGTATACGGATATTGATGGAATGGTATTGAAGGCATTGAGA 640
 * 561 TTTTATCCTCGTG TAGAAGAAGCTGCACACGTTGGTGGTATACGGATATTGATGGAATGGTATTGAAGGCATTGAGA 640

Rd 641 AAAGTTTAAATCCCTGCTTGTGGTAAAGACGGTTCACGTACTGTTCTGTAAGATAAACCTGGCAATATTGTTGACAT 720
 * 641 AAAGTTTAAATCCCTGCTTGTGGTAAAGACGGTTCACGTACTGTTCTGTAAGATAAACCTGGCAATATTGTTGACAT 720

Rd 721 ATCTCCGATGAGAAAAAATATGATGCACAAGATGTTACCTTAAGTATCGATGAAAAATTGCAATCTATGGTGTATCGTGA 800
 * 721 ATCTCCGATGAGAAAAAATATGATGCACAAGATGTTACCTTAAGTATCGATGAAAAATTGCAATCTATGGTGTATCGTGA 800

Rd 801 SATTA AAAAGGCGGTGCTGAGAAATAATGCTGATCTGGTACTGCGGTGTTAGTTGATGTTCTGCAACAGGGGAAGTGTAG 880
 * 801 SATTA AAAAGGCGGTGCTGAGAAATAATGCTGATCTGGTACTGCGGTGTTAGTTGATGTTCTGCAACAGGGGAAGTGTAG 880

Rd 881 CTATGGCGACTGCGCCCTCTTATAATCCAAACAACCGTGTCGGCGTGAAATCAGAGTTAATGCGTAACCGTGCAATTACC 960
 * 881 CTATGGCGACTGCGCCCTCTTATAATCCAAACAACCGTGTCGGCGTGAAATCAGAGTTAATGCGTAACCGTGCAATTACC 960

Rd 961 SATACTTTTGAGCCAGGTTCTACGGTAAAAACCTTCGTTGTTTAAACCGCACTTCAACGAGGTGTAGTTAAACGAGATGA 1040
 * 961 SATACTTTTGAGCCAGGTTCTACGGTAAAAACCTTCGTTGTTTAAACCGCACTTCAACGAGGTGTAGTTAAACGAGATGA 1040

Rd 1041 AATTATTGATACCTACGTCCTTTAAATTAAGCGGTAAAGAAATTTGGACGTTGCACCTCGTCTGCAACAAACTTTAGATG 1120
 * 1041 AATTATTGATACCTACGTCCTTTAAATTAAGCGGTAAAGAAATTTGGACGTTGCACCTCGTCTGCAACAAACTTTAGATG 1120

Rd 1121 AGATTTTAAATGAATCTCTAGTAACCGTGGTGTAGCTCGCTTGCAATTGCTATGCCACCTAGTGCATTATGGAAACTTAT 1200
 * 1121 AGATTTTAAATGAATCTCTAGTAACCGTGGTGTAGCTCGCTTGCAATTGCTATGCCACCTAGTGCATTATGGAAACTTAT 1200

Rd 1201 CAAAATGCAAGTTTAAAGTAAACCGACAGATTTAGGCTTGATCGGAGAACAAAGTTGGGATTTTGAATGCAAAATCGTAAACG 1280
 * 1201 CAAAATGCAAGTTTAAAGTAAACCGACAGATTTAGGCTTGATCGGAGAACAAAGTTGGGATTTTGAATGCAAAATCGTAAACG 1280

Rd 1281 CTGGGCAGATATTGAAGCTGCAACAGTCGCTTATGGTTAGGTTATTACTGCGACACCTTTACAAATTGCTCGTGCCATG 1360
 * 1281 CTGGGCAGATATTGAAGCTGCAACAGTCGCTTATGGTTAGGTTATTACTGCGACACCTTTACAAATTGCTCGTGCCATG 1360

Rd 1361 CAACCCCTGGTAGTTTCGGTGTATTATCGTCCGCTTTCTATCACTAAAGTTGATCGGCCAGTTATTGGGAAACGGGTTTTCT 1440
 * 1361 CAACCCCTGGTAGTTTCGGTGTATTATCGTCCGCTTTCTATCACTAAAGTTGATCGGCCAGTTATTGGGAAACGGGTTTTCT 1440

Rd 1441 TCTGAAAAAATAACTAAAGATATTGTGGGAATTTTAGAGAAAGTATGCAATTA AAAAATAAACCGCAATGGTGGAGGCTA 1520
 * 1441 TCTGAAAAAATAACTAAAGATATTGTGGGAATTTTAGAGAAAGTATGCAATTA AAAAATAAACCGCAATGGTGGAGGCTA 1520

Rd 1521 CCGTGTGCGCGTAAAAACAGGTAGCGACGTAAATATGAAAAATGGACATTATGCTTAAATAAGTATGTGSCATTACTG 1597
 * 1521 CCGTGTGCGCGTAAAAACAGGTAGCGACGTAAATATGAAAAATGGACATTATGCTTAAATAAGTATGTGSCATTACTG 1600

Rd 1598 GGGGATTTGCACCAATTAGTGATCCTCGTTATGCAATTAGTGGTTTGGATTAATGATGATGCAAAAAGCTGGGAAATATTATGGT 1677
 * 1601 GGGGATTTGCACCAATTAGTGATCCTCGTTATGCAATTAGTGGTTTGGATTAATGATGATGCAAAAAGCTGGGAAATATTATGGT 1680

Rd 1678 GGTGCGGTTTCTGCTCCTGTATTCCTCTAACATTATGGGTATGCTTACGTGCAAAATGCTATTCCGCAAGATGCTGAAAG 1757
 * 1681 GGTGCGGTTTCTGCTCCTGTATTCCTCTAGTATTATGGGTATGCTTACGTGCTAAAGCAATTCCCAAGATGCTGAAAG 1760

Rd 1758 AGCTGAAAAACACAAACGAAAAAGTGCAAAAACGATTGTTTATATTGGGAGAACCAAGAATCAAAAAATGAAATTAA 1833
 * 1761 AAGCAGAAAA--AACAAAGAAAAAGTGGCAAAACGATTGTTATATTTGGGAGACCTTAAGAATCAAAAAATGAAATTAA 1833

* *ftsI* sequence of *H. influenzae* 2011-92 and 2011-118 isolates.

B.

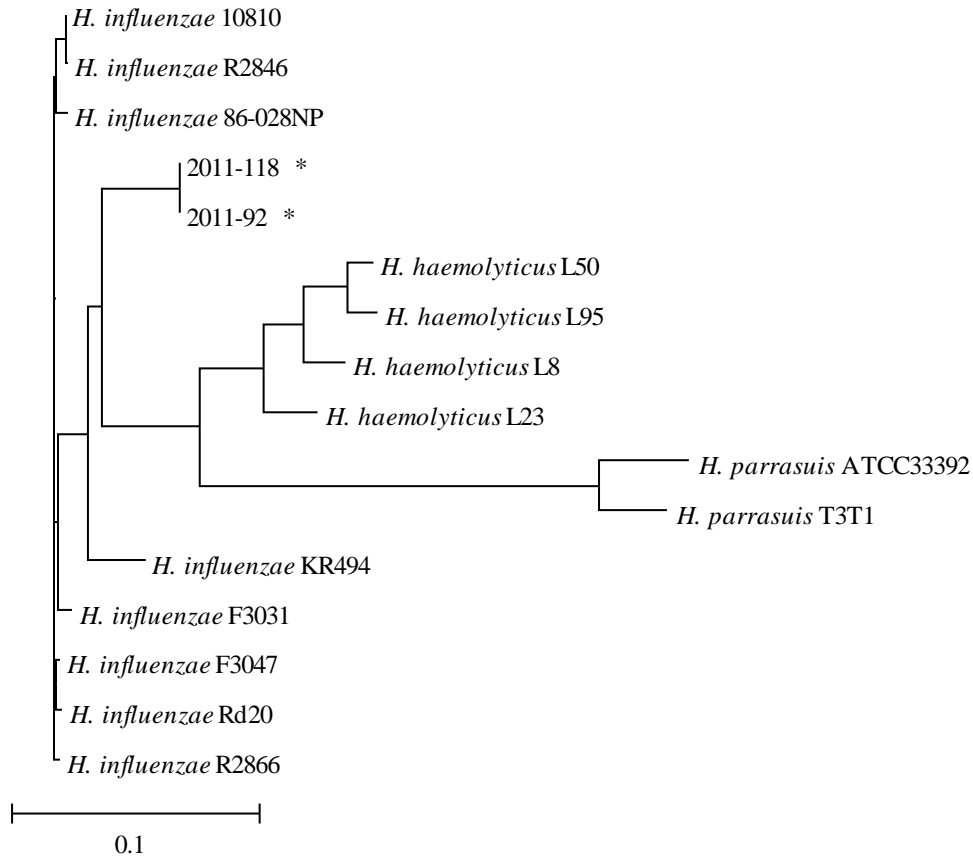


Fig. 5. Diversity of *ftsI* genes in non-classified BLNAR *H. influenzae* isolates found in this study B, Neighbour-joining dendrogram of *ftsI* sequences of two non-classified *H. influenzae* isolates and *Haemophilus* spp. The dendrogram was generated in tree view based on full-length *ftsI* sequences.

* non-classified *H. influenzae* 2011-92 and 2011-118 isolates.

3. BLNAR に対する各種薬剤感受性

β -lactam 系薬耐性株の各種抗菌薬感受性を明らかにするために、PBP3 上のアミノ酸置換による β -lactam 系薬耐性クラス別に分類し、抗菌薬感受性の解析を行った (Table 5)。

その結果、Cephem 系薬の CTRX や CTX と carbapenem 系薬の MEPM や TBPM は全ての耐性クラスに良好な感受性率を維持していた。しかし、cephem 系薬では S385T を有する株で、また、carbapenem 系薬では N526K を有する株で、MIC₅₀、MIC₉₀ が 1~2 段階程高値を示した。また、fluoroquinolone 系薬では、全ての株が高い感受性率を示した。

一方で、macrolide 系薬の CAM に対して、低度耐性株 (MIC = 16 μ g/mL) が認められた。2007 年の CAM の感受性率は、70.9%であったが、2010 年を境に減少しており、2012 年には 52.9%に低下していた。また、2007 年から 2009 年と 2010 年から 2012 年の 3 年間ごとの感受性率を比較したところ (Fig. 6)、感受性率が有意に低下していた ($P < 0.05$)。さらに、CAM では、PBP3 に 2 置換を有する株の方が、低い感受性率を示した。特に CAM 耐性株は、全て PBP3 に 2 つのアミノ酸置換を有していた。一方、AZM では高い感受性率を示したが、CAM 耐性株 (MIC ≥ 32 μ g/mL) において、AZM の MIC 値は、全てブレイクポイント付近 (MIC = 4 or 8 μ g/mL) であった。また、2010 年から 2012 年において、感受性から外れた株が 2 株 (1.3%) 認められた。

Table 5. Antimicrobial susceptibilities for clinical BLNAR *H. influenzae* isolates

Antimicrobial agent	Amino acid substitutions	2007 ~ 2009 (n = 149)				2010 ~ 2012 (n = 155)			
		MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC range	% S ^{a)}	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC range	% S ^{a)}
Amoxicillin / clavulanic acid	N526K or R517H (I)	8	16	2 - 32	31.3	16	16	2 - 16	22.2
	S385T and R517H (II)	8	8	2 - 8	33.3	4	8	2 - 16	52.9
	S385T and N526K (III)	16	32	2 - 32	5.0	16	32	4 - 32	7.9
	Non-classified type					32	32	32	NC
Ampicillin	N526K or R517H (I)	2	8	2 - 16	0	4	8	2 - 8	0
	S385T and R517H (II)	8	8	2 - 16	0	4	8	2 - 16	0
	S385T and N526K (III)	4	16	2 - 32	0	8	16	2 - 16	0
	Non-classified type					16	16	16	NC
Ceftriaxone	N526K or R517H (I)	≤0.063	0.125	≤0.063 - 0.125	100.0	0.125	0.25	≤0.063 - 0.25	100.0
	S385T and R517H (II)	0.25	0.25	≤0.063 - 0.5	100.0	0.25	1	0.125 - 1	100.0
	S385T and N526K (III)	0.25	0.25	≤0.063 - 1	100.0	0.25	0.5	≤0.063 - 4	99.2
	Non-classified type					0.125	0.25	0.125 - 0.25	NC
Cefotaxime	N526K or R517H (I)	0.25	1	≤0.063 - 1	100.0	0.25	1	≤0.063 - 1	100.0
	S385T and R517H (II)	1	2	0.25 - 4	91.7	1	2	≤0.063 - 4	94.1
	S385T and N526K (III)	1	2	0.25 - 4	96.7	1	4	≤0.063 - 4	88.9
	Non-classified type					1	1	1	NC
Cefcapene	N526K or R517H (I)	0.5	4	≤0.063 - 4	-	2	2	0.25 - 2	-
	S385T and R517H (II)	2	4	0.5 - 8	-	4	4	1 - 4	-
	S385T and N526K (III)	2	8	≤0.063 - 16	-	4	8	0.5 - 16	-
	Non-classified type					1	2	1 - 2	NC
Cefditoren	N526K or R517H (I)	0.125	0.25	≤0.063 - 2	-	0.125	0.25	≤0.063 - 0.25	-
	S385T and R517H (II)	0.5	0.25	≤0.063 - 2	-	0.25	0.5	≤0.063 - 0.5	-
	S385T and N526K (III)	0.25	0.5	≤0.063 - 2	-	0.25	0.5	≤0.063 - 1	-
	Non-classified type					0.25	0.5	0.25 - 0.5	NC
Meropenem	N526K or R517H (I)	0.25	1	0.125 - 2	81.3	0.25	1	0.125 - 1	66.7
	S385T and R517H (II)	0.125	0.25	0.125 - 0.25	100.0	0.125	0.25	≤0.063 - 0.25	100.0
	S385T and N526K (III)	0.5	1	0.125 - 2	77.7	0.25	1	≤0.063 - 2	85.7
	Non-classified type					0.25	1	0.25 - 1	NC
Tebipenem	N526K or R517H (I)	0.5	2	0.25 - 4	-	0.5	2	0.125 - 2	-
	S385T and R517H (II)	0.125	0.25	≤0.063 - 0.5	-	0.125	0.25	≤0.063 - 0.25	-
	S385T and N526K (III)	0.5	1	0.125 - 2	-	0.5	1	≤0.063 - 2	-
	Non-classified type					1	1	1	NC
Clarithromycin	N526K or R517H (I)	8	16	2 - 16	87.5	8	16	2 - 16	83.3
	S385T and R517H (II)	8	16	4 - 16	75	8	16	2 - 16	64.7
	S385T and N526K (III)	8	16	≤0.063 - 32	71.9	8	16	2 - 32	58.7
	Non-classified type					8	16	8 - 16	NC
Azithromycin	N526K or R517H (I)	2	2	0.5 - 4	100.0	1	4	0.5 - 4	100.0
	S385T and R517H (II)	2	2	1 - 4	100.0	1	4	≤0.063 - 4	100.0
	S385T and N526K (III)	2	4	≤0.063 - 4	100.0	2	4	≤0.063 - 8	98.4
	Non-classified type					2	4	2 - 4	NC
Levofloxacin	N526K or R517H (I)	≤0.063	≤0.063	≤0.063	100.0	≤0.063	≤0.063	≤0.063	100.0
	S385T and R517H (II)	≤0.063	≤0.063	≤0.063	100.0	≤0.063	≤0.063	≤0.063	100.0
	S385T and N526K (III)	≤0.063	≤0.063	≤0.063 - 0.125	100.0	≤0.063	≤0.063	≤0.063 - 0.125	100.0
	Non-classified type					≤0.063	≤0.063	≤0.063	NC
Tosufloxacin	N526K or R517H (I)	≤0.063	≤0.063	≤0.063	-	≤0.063	≤0.063	≤0.063	-
	S385T and R517H (II)	≤0.063	≤0.063	≤0.063	-	≤0.063	≤0.063	≤0.063	-
	S385T and N526K (III)	≤0.063	≤0.063	≤0.063 - 0.125	-	≤0.063	≤0.063	≤0.063 - 0.125	-
	Non-classified type					≤0.063	≤0.063	≤0.063	NC

^{a)}, % S, percent of susceptible strains. Susceptible strains were evaluated according to breakpoints defined by CLSI.

MIC₅₀ and MIC₉₀, the values indicate the minimum inhibitory concentration (MIC) (μg/ml) that inhibit the growth of 50 and 90% of strains, respectively; MIC range, range of MIC (μg/ml).

-, the breakpoints were not defined by CLSI; NC, not calculated because of small number of isolates; I, class I; II, class II; III, class III.

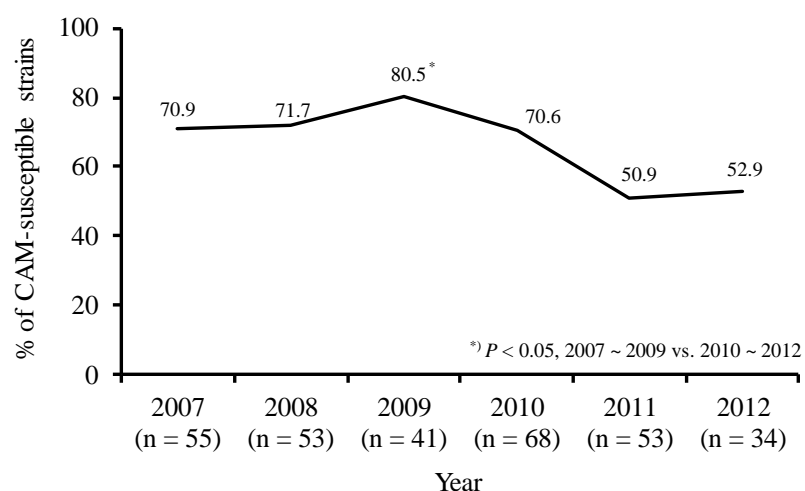


Fig. 6. Annual transition of clarithromycin-susceptible strains in BLNAR *H. influenzae*
 P value was calculated by χ^2 test

4. Clarithromycin 耐性株 (MIC ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$) の遺伝学的特徴

CAM 耐性株間の関連を明らかにするために、計 13 株の CAM 耐性株 (MIC ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$) について MLST 解析を行った。同定された sequence type (ST) は、9 種類 (ST159、156、107、396、556、834、1423、1424、1425) であり、ST159 が最も多く検出され、4 株 (30.8%)、次いで ST156 が 2 株 (15.4%) であった。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、遺伝的多様性があることが示された。

【 考 察 】

本邦において BLNAR は急速に拡がり、抗菌薬を選択するうえで難渋する症例が増えている⁶⁸⁾。そこで、本章では、2007 年から 2012 年度に東京医科大学八王子医療センターで分離された BLNAR を集め、 β -lactam 系薬耐性に関与する PBP3 の変異部位及び抗菌薬感受性の解析を行った。

遺伝学的に PBP3 のアミノ酸置換によって分類した β -lactam 系薬の耐性クラスとその感受性は、非常に高い相関性が認められた。PBP3 上にアミノ酸置換を 2 置換保有する株は、 β -lactam 系薬に 1 置換のみの株よりも低感受性を示し、既報の報告と一致していた³⁸⁾。第 3 世代 cephalosporin 系薬では良好な感受性が得られたが、CTX では既報の通り S385T を有する株で、感受性の低下が認められた⁶⁹⁾。一方、carbapenem 系薬である MEPM と TBPM には良好な感受性率を示したが、N526K を有する株では、感受性率が低下していた。これは、BLNAR の治療において、アミノ酸置換の数だけではなく、アミノ酸置換の部位についても検討を行う必要があることを強く示している。従って、BLNAR の耐性機構と薬剤感受性を調査することは、抗菌薬を選択する上で有用な指標の一つになると考えられる。また、注射用第 3 世代 cephalosporin や carbapenem 系薬は、中等度から重症の小児における治療薬として有効であるが、不適切に使用することで今後より高度な耐性株が出現する可能性が示唆された。

さらに、本研究で分離された BLNAR の中に、*ftsI* 遺伝子後半部のトランスペプチダーゼ領域が大きく変化していた株が出現していた。*H. influenzae* は、自然形質転換能を持ち、外来遺伝子を取り込みやすいことが知られている⁷⁰⁻⁷²⁾。また、*Haemophilus* 属菌間で、*ftsI* 遺伝子の水平伝播が報告されている^{59, 60)}。しかし、この領域の相同性検索では、類似配列は認められなかった。今後、遺伝子変異だけではなく、外来遺伝子の取り込みにより、*H. influenzae* のゲノムに大きな再編が加えられ、 β -lactam 系薬に低感受性を示す新たな株が流行する可能性が考えられる。そのため、ゲノム再編成のメカニズムに関しては、更なる解析が必要である。

BLNAR に対しては、一部の macrolide 系薬 (AZM、CAM) や fluoroquinolone 系薬は効果があるとされているため、代替薬として使用することが可能とされている。Fluoroquinolone 系薬は全ての株が感受性を示し、耐性株は認められなかった。そのため、治療薬の選択肢として効果が期待できると考えられる。しかし、本研究より、macrolide 系薬の CAM に対しては、2010 年を境に CAM で低度耐性株 (MIC = 16 μ g/mL) が増加し、また、耐性株 (MIC \geq 32 μ g/mL) が出現していることが明らかとなった。2009 年に小児領域において AZM の小児細粒が導入されており、市中感染症に対する macrolide 系薬の使用が増加している。このことが選択圧となり、同系統である CAM の薬剤感受性の変化に関連している可能性が考えられた。AZM の薬物動態を見ると、成人に AZM を 500 mg で経口投与した場合、その最高血中濃度は、0.58 \pm 0.11 μ g/mL であることが示されている⁷³⁾。また、AZM は、約 66 時間の長い半減期を有している

ため、AZM 投与後、MIC 値を下回る濃度で長時間、菌が曝露される可能性がある。これらは成人用量のため、小児用量ではさらに低い値を示すことが考えられる。従って、AZM の不適正使用は十分な薬剤濃度を維持できず、薬剤選択圧が持続してかかることで、更なる耐性株の出現を招く恐れがある。実際に、他の呼吸器感染症の起因菌である *Streptococcus pneumoniae* や *Mycoplasma pneumoniae* でも macrolide 系薬耐性化が問題となっており^{74,75)}、*H. influenzae* に対しても同様であると考えられる。さらに、CAM 耐性株は、全て PBP3 にアミノ酸置換が複数入っていた株であり、BLNAR の多剤耐性化が危惧された。また、CAM 耐性株の MLST 解析の結果から、9 つの ST が同定された。これらの clonal complex (CC) は異なっており、様々な遺伝学的背景を持っていると考えられる。このことから、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。今後、BLNAR の更なる多剤耐性化による治療の難渋化が予想される。

本章から、BLNAR の治療では、CTX、CTRX、carbapenem 系薬及び fluoroquinolone 系薬は、有効な治療薬となり得ることが明らかとなった。しかし、抗菌薬の上市と共に、菌を取り巻く環境は大きく変化し、新しいタイプの *ftsI* を持つ株の出現も明らかになった。さらに、小児呼吸器感染症に汎用される CAM においても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。よって、抗菌薬感受性の動向及び耐性機構について、継続して注視していく必要があると考えられる。

第 2 章

Macrolide 耐性の分子メカニズムの解析

【 背 景 】

第 1 章において、臨床分離 BLNAR 株の clarithromycin (CAM) 感受性率が有意に低下し、CAM 耐性株が出現していることを見出した。

一般的に、細菌の macrolide 系薬耐性化機構は、リボソームの構造変化、外来遺伝子の獲得、薬剤排出ポンプの亢進の 3 種に大別される。

第 1 は、リボソームタンパク 50S サブユニットを構成する L4 及び L22 タンパク上に生じたアミノ酸置換や 23S rRNA ドメイン V 中の薬剤作用部位の変異によるものであり、macrolide 系薬の結合能が低下することで耐性化する^{76,77)}。

第 2 は、薬剤耐性に関与する外来遺伝子の獲得によるものである。主として、薬剤排出タンパク遺伝子 (*mef*) あるいは、23S rRNA メチラーゼ遺伝子 (*erm*) が関与する。*mef* は、12 回膜貫通型の排出タンパクをコードし、プロトン駆動力を用いて、macrolide 系薬を菌体内から排出する⁷⁸⁾。一方、*erm* は、23S rRNA のドメイン V の adenine (A) をジメチル化することによって、macrolide 系薬の結合を妨げる⁷⁸⁾。*mef* や *erm* の獲得は、一般的に *Streptococcus* 属や *Staphylococcus* 属で知られ、14 員環、15 員環 macrolide 系薬に中等度から高度耐性を示す⁷⁹⁻⁸¹⁾。

第 3 は、細菌が従来持っている染色体性異物排出ポンプの亢進である。細菌の排出システムは、排出ポンプの構造や共役するエネルギーの違いから大きく 5 つのファミリーに分類されている⁸²⁻⁸⁴⁾。これまでに、ATP の加水分解をエネルギーとして異物を排出する ABC (ATP binding cassette) 型、内膜コンポーネント、外膜コンポーネント、及びそれらを繋いでいるアダプタータンパク質からなる RND (resistance nodulation cell-division) 型、プロトン駆動型で最も主要なファミリーである MF (major facilitator) 型、4 回膜貫通型構造である SMR (small multidrug resistance) 型、ナトリウム又はプロトンを駆動力とする MATE (multidrug and toxic compound extrusion) 型の 5 つが知られている⁸⁵⁾。このうち、RND 型は、細胞外膜を有するグラム陰性菌に特有の異物排出システムであり、*Escherichia coli* では、AcrAB-TolC が主なポンプとして機能している。AcrAB-TolC は、抗菌薬、消毒剤、色素など様々な化合物を基質として認識するが、この中に macrolide 系薬も含まれる^{86,87)}。

H. influenzae においては、過去に L4、L22 タンパク上のアミノ酸置換、23S rRNA 上の変異や、外来遺伝子の獲得について報告されている^{88,89)}。しかし、外来遺伝子保持株は実際に表現型として耐性を示していないものも多く、この獲得株の存在については結論がでない⁸⁹⁻⁹²⁾。

また、*H. influenzae* は、ゲノム解析により、染色体上に少なくとも 5 つの排出系 (YieO、YdeA、EmrB、NorM、AcrB) を保有することが知られている^{88,93,94)}。*H. influenzae* の染色体性多剤排出ポンプのうち、特に RND ファミリーに属する AcrAB ポンプは、penicillin 系薬である ampicillin や macrolide 系薬である erythromycin などの基質となるため、薬剤感受性に影響していることが知られている^{88,93,95)}。

本章では、CAM 耐性 BLNAR の臨床分離株について、その耐性機構を明らかにするために、上述した macrolide 耐性遺伝子や変異の存在ならびに耐性の分子メカニズムについて検討した。

【 材 料 と 方 法 】

1. 使用菌株と培養条件

使用菌株は、第 1 章で用いた菌株のうち、2010 年から 2012 年の間に東京医科大学八王子医療センターから分離された 7 株の CAM 耐性 BLNAR を用いた (MIC = 32 $\mu\text{g/mL}$)。また、標準株として *H. influenzae* ATCC49247 株と *H. influenzae* Rd 株を用いた。培養には、チョコレート寒天培地または、 β -NAD と hemin (Wako) を 15 $\mu\text{g/mL}$ となるように添加した BHI broth (sBHI broth) を用いた⁹⁶⁾。菌株の培養と保存方法は、第 1 章 - 【材料と方法】 - 2 に記した方法で行った。

2. Macrolide 耐性遺伝子及び変異の検出 [*mef*(A)、*erm*(B)、L4、L22]

mef(A) 及び *erm*(B) の検出は、Noguchi らの方法で PCR を行った⁹⁷⁾。

PCR 条件は、94°C、2 min の初期変性、94°C、15 sec の変性、55°C、15 sec のアニーリング、72°C、30 sec の伸長反応とし、25 サイクル行った。L4 と L22 は、Clark らの方法で PCR 及びシーケンス反応を行った⁹⁸⁾。PCR 条件は、94°C、2 min の初期変性、94°C、15 sec の変性、50°C、30 sec のアニーリング、72°C、30 sec の伸長反応とし、25 サイクル行った。PCR 及びシーケンス反応は、第 1 章 - 【材料と方法】 - 3 と 4 に記した方法で行った。増幅及びシーケンスに使用したプライマーは Table 6 に示した。

3. 薬剤感受性試験

薬剤は、azithromycin (AZM)、CAM、minocycline (MINO: Wako)、norfloxacin (NFLX: Wako)、ethidium bromide (EB: Wako) を用いた。薬剤排出ポンプ阻害剤は、phenylalanine-arginine β -naphthylamide (PA β N: Sigma-Aldrich Japan)、Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazine (CCCP: Wako) を用いた。薬剤感受性試験は、第 1 章 - 【材料と方法】 - 5 に記した方法で行った。CAM 及び AZM では、排出ポンプ存在下及び非存在下における MIC 値を調査した。排出ポンプ阻害剤の添加濃度は、PA β N が 25、50 $\mu\text{g/mL}$ 、CCCP が 0.75、1.5 $\mu\text{g/mL}$ で行った。この実験は 3 回行い、全て同じ値を示すことを確認した。また、希釈段階を細分化した。抗菌薬の判定基準は、Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) の breakpoint に準じた (Table 4)⁶⁷⁾。CLSI による感受性の判定基準より、CAM の MIC が 32 $\mu\text{g/mL}$ 以上の株を CAM 耐性株、AZM の MIC が 8 $\mu\text{g/mL}$ の株を AZM 低度耐性株と定義した⁶⁷⁾。

Table 6. Oligonucleotide primers used in this study

Target gene	Primer	Sequence (5' to 3')	Description	Reference
<i>mef(A)</i>	mef-F	TGTGCTAGTGGATCGTCATGA	PCR	97
	mef-R	TGCAATCACAGCACCCAATA	PCR	
<i>erm(B)</i>	erm(B)-F	GATTCTACAAGCGTACCTTGGA	PCR	97
	erm(B)-R	TCTGGAACATCTGTGGTATGG	PCR	
L4	L4-F	TTAAGCCGGCAGTTAAAGC	PCR, Sequence	98
	L4-R	CACCTAGCAAACGTTCTTG	PCR, Sequence	
L22	L22-F	CGGCAGATAAGAAAGCTAAG	PCR, Sequence	98
	L22-R	TGGATGTACTTTTGTACCC	PCR, Sequence	
<i>ydeA</i>	YdeA-F	CAGCCTTGTTGTTTATTTGGG	RT-PCR	this study
	YdeA-R	GGCGATATTTTAAGTGC GTT	RT-PCR	this study
<i>yieO</i>	YieO-F	ATTAATACGCTGGCTGTAGG	RT-PCR	this study
	YieO-R	CATAAGCGACCAAACAAGG	RT-PCR	this study
<i>emrB</i>	EmrB-1-F	CAGAGCCAAGAAGAGAC AAC	RT-PCR	this study
	EmrB-1-R	CTCTTGCCACCTTTATGCAG	RT-PCR	this study
<i>bcr</i>	Bcr-F	TGCTTCCAAAGCAGAAGG	RT-PCR	this study
	Bcr-R	ATGTCCACCAATCACGTTAG	RT-PCR	this study
<i>norM</i>	NorM-F	GCCATACCAATCGACATAGG	RT-PCR	this study
	NorM-R	CGACAGCTATTGTGAAGTGG	RT-PCR	this study
<i>acrB</i>	AcrB-F	ATCATTACCGCGTTTCAGTC	RT-PCR	this study
	AcrB-R	ACTGAATGGCAAGTACCAAG	RT-PCR	this study
<i>gyrB</i>	GyrB-F	GGAAAATCCTGCAGATGC	RT-PCR	this study
	GyrB-R	AAGCAACGTACGGATGTG	RT-PCR	this study
<i>acrRAB</i> operon	acrR-F	TGCGACAAGCTAAAACAGAC	Sequence	this study
	acrR-R	CTGTGTGCAAATTGTTCAAG	Sequence	this study
	acrR-up 1	TACAGATAAGTATTGTTACG	Sequence	this study
	acrR-down 1	TATGTGAGCGTTTTGGTC	Sequence	this study
	acr-up	GGGTTTACGGCTTACCTAC	Sequence	this study
	acr-down	GCGCAGAAAATCTCGATG	Sequence	this study
	acr-up 2	GCTTGAACAATTTGCACAC	Sequence	this study
	acr-down 2	TAACCTAAGTGCGGTTTG	Sequence	this study
	acr-up 3	ATGCCAGAATCTTCAAGCC	Sequence	this study
	acr-down 3	AGGAATTCTCTGCGGTG	Sequence	this study
	acr-up 4	AATCACTGCGATTGAACC	Sequence	this study
	acr-down 4	TTCGGGTGTTTCCATTAC	Sequence	this study
	acr-up 5	CTACTACAGTCATTACAGTG	Sequence	this study
	acr-down 5	ACGGAACGAACCGATAAAC	Sequence	this study

The primers used for the detection of the chromosomal multidrug efflux pump genes were designed based on the nucleotide sequence of *H. influenzae* Rd.

4. RT-PCR 法による *H. influenzae* の染色体性多剤排出ポンプ遺伝子の発現量の解析

H. influenzae の染色体性多剤排出ポンプである *yieO*、*ydeA*、*emrB*、*norM*、*acrB* 遺伝子の発現量は、Table 6 の各種プライマーを用いて、半定量的 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR 法) で解析した。

微好気性条件下、37°C で、チョコレート寒天培地上で培養した single colony を sBHI broth に懸濁し、微好気性条件下、37°C で 18 ~ 24 hr 静置培養した。培養後の菌は、sBHI broth で 1/10 希釈して、さらに、37°C、3 hr 静置培養した。培養液を 12,000 × g、10 min で遠心にて集菌し、High Pure RNA Isolation Kit (Roche) を用いて、total RNA を抽出・精製した。定量後、cDNA の合成には SuperScript™ III First-strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR (Thermo Fisher Scientific) を用いた。精製した cDNA を用いて各々の排出ポンプ遺伝子の PCR を GoTaq® Green Master Mix (Promega KK) を用いて行った。PCR の条件は、95°C、2 min の初期変性、95°C、30 sec の変性、52°C、30 sec のアニーリング、72°C、30 sec の伸長反応とし、25 サイクル行った。解析は、ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて行った。Internal control として、恒常的に発現している *gyrB* を用いた (Table 6)⁹⁹⁾。結果は、独立した 3 回の実験の平均値を示した。

5. *acr* オペロンの塩基配列決定

H. influenzae Rd 株の塩基配列 (GenBank accession no. NC_000907) を基に、*acrR*、*acrA*、*acrB* のプライマー (Table 6) を作成した。これらのプライマーを用い、CAM 耐性株の *acr* オペロン全長の塩基配列を解析した。まず、第 1 章 - 【材料と方法】 - 3 に記した方法で、Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs Japan) を用いて PCR を行い、*acr* 遺伝子を増幅させた。PCR 条件は、95°C、2 min の初期変性、95°C、30 sec の変性、52°C、30 sec のアニーリング、72°C、3 min の伸長反応とし、30 サイクル行った。PCR 産物は、第 1 章 - 【材料と方法】 - 4 に記した方法でシーケンス反応を行い、塩基配列及びアミノ酸置換部位の解析を行った。

6. *H. influenzae* Rd 株のコンピテントセルの作製

H. influenzae Rd 株のコンピテントセルの作製は、生方らの方法を改変して行った³⁸⁾。チョコレート寒天培地で培養した *H. influenzae* Rd 株の single colony を sBHI broth に懸濁し、微好気条件下で、37°C、24 hr 静置培養した。培養した *H. influenzae* Rd 株は、sBHI broth で 1/10 に希釈し、さらに、37°C、150 rpm で振とう培養した。OD₆₀₀ = 0.3 まで増殖させ、3,080 × g、5 min で遠心し集菌した。遠心後、上清を捨て、SG buffer (10% glycerol、10% sucrose) で懸濁し、再度、3,080 × g、5 min で遠心を行い、2 回洗浄した。洗浄後、SG buffer を加えて懸濁した。

7. エレクトロポレーション法

形質転換は、エレクトロポレーション法で行った。*H. influenzae* Rd 株のコンピテントセルに精製 DNA を 1 μ g 加え、混合し、氷上においた。これを氷冷した electroporation cuvette (M β P: Molecular Bio Products) に移した。エレクトロポレーションは、Gene Pulser[®] II (BioRad) を用いて、1.25 kV/cm、25 μ F、200 Ω で行った。sBHI broth で 18~24 hr の培養を行った後、16 μ g/mL の CAM 含有チョコレート寒天培地に塗抹した。

8. AcrB の立体構造予測

AcrB の立体構造予測は、膜貫通領域予測ツールである CCTOP (Constrained Consensus TOPology prediction server, <http://www.cctop.enzim.ttk.mta.hu/>) を用いて行った。

9. 統計解析

統計学的解析は、JMP software (SAS Institute) を用いて、Student's *t*-test により検定し、 $P < 0.05$ のときに統計学的に有意とした。

10. 塩基配列の登録

H. influenzae 2012-42 の *acrR* (accession number LC126887) と *acrRAB* (accession number LC269307) 及び *H. influenzae* 2011-70 の *acrRAB* 領域 (accession number LC269308) の塩基配列は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) に登録した。

【 結 果 】

1. Macrolide 耐性因子の解析 [*mef*(A)、*erm*(B)、L4、L22]

2010 年から 2012 年の間に分離された 7 株の CAM 耐性 BLNAR について、macrolide 耐性遺伝子 *mef*(A) 及び *erm*(B) の検出を PCR で行った。その結果、*mef*(A) と *erm*(B) いずれも検出されなかった。また、リボソームタンパク 50S サブユニットを構成する L4 及び L22 上にアミノ酸置換を伴う変異は認められなかった。

2. 異物排出ポンプ阻害剤の影響

Macrolide 系薬耐性化における染色体性異物排出ポンプの影響を調べるために、抗菌薬と AcrAB の基質である EB の薬剤感受性試験を行った (Table 7)。CAM 耐性株 2012-42 株では、EB の MIC が CAM 感受性株である 2011-130 株と ATCC49247 株と比較して、4~8 倍程高値を示した。また、排出ポンプの影響を受けやすい抗菌薬である MINO 及び NFLX の MIC 値も CAM 感受性株より 2~4 倍程高値を示した。そこで、薬剤排出ポンプ阻害剤である CCCP と PAβN を添加させ、MIC を測定したところ、CAM 耐性株である 2012-42 株の CAM 及び AZM の MIC は、CCCP と PAβN の濃度依存的に低下した (Table 7)。一方、感受性株では、CCCP と PAβN を添加しても MIC 値の大きな低下は認められなかった (Table 7)。従って、この結果は、2012-42 株の CAM 耐性が異物排出ポンプに起因することを示唆していた。

3. *H. influenzae* の染色体性多剤排出ポンプ遺伝子の発現量

Salmonella Typhi や *E. coli* において、排出による薬剤耐性は、排出ポンプ遺伝子の機能的な変異でなく排出ポンプ遺伝子の発現亢進であることが知られている^{100, 101)}。そこで、CAM 耐性株である 2012-42 株、感受性株である 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*) の mRNA 量を半定量的 RT-PCR 法で解析した。これらの株の各染色体性多剤排出ポンプ遺伝子の発現強度を *gyrB* を基準として算出した (Fig. 7)。その結果、CAM 耐性株である 2012-42 株の *acrB* 遺伝子の転写量が、CAM 感受性株である 2011-130 株と ATCC49247 株と比較して、有意に高かった ($P < 0.05$)。一方、全ての株の *yieO*、*ydeA*、*emrB*、*norM* 遺伝子の発現量には有意な差が認められなかった。

Table 7. MICs of CAM-resistant BLNAR and CAM-susceptible BLNAR *H. influenzae*

Strain	ST	CAM	CAM MIC			CAM MIC			AZM	AZM MIC			AZM MIC			MINO	NFLX	EB
			+ CCCP (µg/mL)			+ PAβN (µg/mL)				+ CCCP (µg/mL)			+ PAβN (µg/mL)					
			0.75	1.5	50	0.75	1.5	50		0.75	1.5	50	0.75	1.5	50			
2010-124	1425	32	16	1	32	16	4	2	0.13	2	2	0.25	0.031	8				
2011-54	1424	32	16	4	32	16	4	2	0.5	2	2	0.25	0.031	4				
2011-70	156	32	16	4	16	8	4	1	0.25	2	1	0.25	0.031	8				
2011-72	1423	32	16	1	16	8	4	1	≤0.06	2	1	0.25	0.063	8				
2011-82	556	32	16	0.5	16	8	4	2	0.13	2	2	0.5	0.031	8				
2012-42	156	32	16	4	32	8	8	4	1	4	2	0.5	0.031	≥16				
2012-46	159	32	16	4	16	8	4	2	0.5	2	1	0.5	0.016	8				
2011-130	1838	1	1	1	1	1	0.13	≤0.06	≤0.06	≤0.06	≤0.06	≤0.06	0.008	2				
ATCC49247	368	2	2	1	2	2	0.25	0.25	≤0.06	0.25	0.25	0.13	0.016	2				
<i>H. influenzae</i> Rd	47	8	4	0.25	8	8	0.5	0.5	≤0.06	1	1	0.13	0.016	1				

ST, sequence types; MIC, minimum inhibitory concentration (µg/mL); CAM, Clarithromycin; AZM, Azithromycin; MINO, Mincycline; NFLX, Norfloxacin;

EB, Ethidium bromide; CCCP, Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazine; PAβN, Phenylalanine-arginine β-naphthylamide

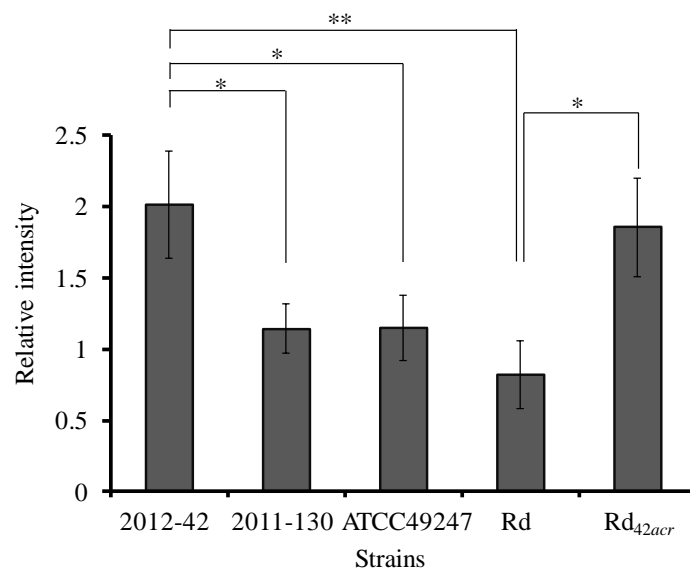


Fig. 7. Transcription level of *acrB* gene in *H. influenzae*

2012-42, clarithromycin-resistant strain;

2011-130, clarithromycin-susceptible strain;

ATCC49247, clarithromycin-susceptible control strain;

Rd, *H. influenzae* Rd;

Rd_{42acr}, Rd strain transformed with the *acrR* gene from strain 42-2012

, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

The statistical analysis was performed by two-tailed student's *t*-test.

4. *acr* オペロン塩基配列の解析

acr 領域は、*acrR* (564 bp)、*acrA* (1,149 bp)、*acrB* (3,099 bp) の順に配置し、負の調節因子である AcrR によって、AcrA 及び AcrB の発現量が調節されている¹⁰⁰⁾。CAM 耐性株と感受性株の違いを検討するために、*acr* 領域 (*acrR*、*acrA*、*acrB*) の DNA シークエンスを行い、すでにゲノムが明らかになっている *H. influenzae* Rd 株 (Accession No. NC_000907) の *acr* 領域と比較を行った。その結果、CAM 耐性株の 2012-42 株では、*acrAB* の負の調節因子をコードする *acrR* 中の 142 番目の塩基において欠損が認められた (Fig. 8)。この変異は、フレームシフトを生じさせ、105 番目のコドンを終始コドンにするナンセンス変異を導いていた。そこで、他の CAM 耐性株についても検討したところ、変異部位は菌株によって異なっていたが、全ての CAM 耐性株で *acrR* 中にナンセンス変異を生じる塩基の挿入や欠損が存在していた (Table 8)。感受性株にもアミノ酸置換が認められたが、ナンセンス変異は認められなかった。

5. Acr の CAM 耐性への関与

acrR 上に認められたフレームシフト変異が、CAM 耐性に関与しているかどうか検討するために、CAM 耐性株である 2012-42 株の *acr* 領域を PCR 法により増幅し、増幅 DNA をエレクトロポレーション法によって、標準株の *H. influenzae* Rd 株に組み込んだ (Rd_{42acr})。この形質導入株 (Rd_{42acr}) の *acr* 領域は DNA シークエンスによって確認した。Rd_{42acr} 株の CAM 及び AZM の MIC 値は、CAM 耐性株である 2012-42 株と同じ MIC 値を示した (Table 9)。また、Rd_{42acr} 株の *acrB* 遺伝子転写量は、親株の *H. influenzae* Rd 株、CAM 感受性株の 2011-130 株やコントロール株の ATCC49247 株と比較して、転写量が有意に高かった ($P < 0.05$) (Fig. 7)。

2012-42	1	ATGCGACAAGCTAAAACAGACTTAGCTGAACAGATTTTTTTCAGCGACAGATCGTTTAATG	60
<i>H. inf</i> Rd	1	ATGCGACAAGCTAAAACAGACTTAGCTGAACAGATTTTTTTCAGCGACAGATCGTTTAATG	60
2012-42	61	GCAAGAGAAGGGTTGAATCAACTTTCTATGCACAAACTTGCGAAAGAAACAAATGTGGCC	120
<i>H. inf</i> Rd	61	GCAAGAGAAGGGTTGAATCAACTTTCTATGCTCAAACTTGCGAAAGAAACAAATGTAGCC	120
2012-42	121	GCAGGAACGATTTACCTTTA- TTTAAAAACAAAGATGAATTGCTTGAAACAATTTGCACAC	179
<i>H. inf</i> Rd	121	GCAGGAACGATTTACCTTTATTTTAAAAACAAAGATGAATTGCTTGAAACAATTTGCACAC	180
2012-42	180	AGAGTGTTTTCAATGTTTATGGCAACACTTGAAAAAGATTTTGATGAAACGAAACCTTTT	239
<i>H. inf</i> Rd	181	AGAGTGTTTTCAATGTTTATGGCAACACTTGAAAAAGATTTTGATGAAACTAAGCCTTTT	240
2012-42	240	TTCGAACCAATATCGACAAATGTGGAAAAACATTTGGTATTTCTTACAAGAAAATCCCCT	299
<i>H. inf</i> Rd	241	TTCGAACAGTATCGACAAATGTGGAAAAACATTTGGTATTTCTTACAAGAAAATCCCCT	300
2012-42	300	ATTCTATCCAATTTAAAGCAATATGAATCTTTGCCATAATTTCAAGGATATTTGTAAAAAC	359
<i>H. inf</i> Rd	301	ATTCTATCCAATTTAAAGCAATATGAATCTTTGCCGAATTTCAAGGATATTTGTAAAAAC	360
2012-42	360	GTTAAAAATTGCCGTTGGGATTTATTTTGTATCAAGGCCCAAAAAGCTGGCTTATTAGCG	419
<i>H. inf</i> Rd	361	ATTAAAAATTGCCGTTGGGATTTATTTTGTATCAAGCACAAAAAGCTGGCTTATTAGCG	420
2012-42	420	GAATTATCTGAAGATATTCTCTTTTTATTAAGTTTGAAAAACAGCGATAAATTTAGCCTCT	479
<i>H. inf</i> Rd	421	GAATTATCTGAAGATATTCTCTTTTTATTAAGTTTGAAAAACGGCGATAAATTTAGCCTCT	480
2012-42	480	GATGCAAAATTTATCGATTTTCGATCTTAAGCCTGAAATTTTGAATCTGTGATTGAACGC	539
<i>H. inf</i> Rd	481	GATGCAAAATTTATCGATTTTCGATCTTAAGCCTGAAATTTTGAATCTGTGATTGAACGC	540
2012-42	540	TCTTGGCGTGCGATTCAGAAATAA	563
<i>H. inf</i> Rd	541	TCTTGGCGTGCGATTCAGAAATAA	564

Fig. 8. Pairwise alignment of *acrR* genes in *H. influenzae*

The clarithromycin-resistant strain 2012-42 had a deletion of 141 nucleotides in *acrR* (accession no. LC126887).

The mutation site was indicated by the arrow.

Table 8. Identified amino acid substitutions in the *acrR* gene of *H. influenzae* used in this study

Strain	Mutation sites in <i>acrR</i> gene ^{*)}	Protein synthesis (stop site)
2010-124	Deletion of base T in nucleotide 453	Incomplete (152)
2011-54	Substitution of base C to A in nucleotide 400	Incomplete (134)
2011-70	Deletion of base T in nucleotide 141	Incomplete (105)
2011-72	Insertion of 2 bases (GG) behind nucleotide 200	Incomplete (106)
2011-82	Substitution of base C to T in nucleotide 256	Incomplete (86)
2012-42	Deletion of base T in nucleotide 141	Incomplete (105)
2012-46	Substitutions of 2 bases C to T in nucleotide 246 and G to A in nucleotide 248	Incomplete (83)
2011-130	multiple substitutions	Complete

* Reference with *acrR* genes of *H. influenzae* Rd

Table 9. MICs of *H. influenzae* Rd strains transformed with 2012-42 *acr* gene

Strain	CAM	CAM MIC		CAM MIC		AZM	AZM MIC		AZM MIC		MINO	NFLX	EB
		+ CCCP (µg/mL)	0.75	1.5	25	50	+ CCCP (µg/mL)	0.75	1.5	+ PAβN (µg/mL)			
<i>H. inf</i> Rd	8	4	0.25	8	8	1	0.5	≤0.06	1	1	0.13	0.016	1
<i>H. inf</i> Rd _{42acr}	32	16	2	32	16	8	4	0.5	4	4	0.5	0.031	8
2012-42	32	16	4	32	16	8	4	1	4	2	0.13	0.016	≥16

MIC, minimum inhibitory concentration (µg/mL); CAM, Clarithromycin; AZM, Azithromycin; MINO, Mincocycline; NFLX, Norfloxacin; EB, Ethidium bromide; CCCP, Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone; PAβN, Phenylalanine-arginine β-naphthylamide

6. AcrB 領域の解析

2010 年から 2012 年の間に分離された 7 株の CAM 耐性 BLNAR のうち、2012-42 株のみ AZM の MIC 値が 8 $\mu\text{g/mL}$ であり、明らかな低度耐性を示していた (Table 7)。そこで、この違いを明らかにするために、CAM 耐性株のうち、MLST で遺伝学的バックグラウンドが同一であり、かつ *acrR* の変異部位が同じ AZM 低度耐性株 (AZM MIC = 8 $\mu\text{g/mL}$) の 2012-42 株と AZM 感受性株 (AZM MIC = 4 $\mu\text{g/mL}$) の 2011-70 株を用い、AZM 低度耐性化メカニズムについて検討した。

2011-70 株と 2012-42 株の *acrR* から *acrB* までの全塩基配列 (4,891 bp) を決定し、アミノ酸配列の比較を行った。その結果、AZM 低度耐性株である 2012-42 株では、AcrB 領域の 327 番目のアミノ酸が arginine から serine に置換しており、1 ヶ所のみ異なっていた (Fig. 9)。さらに、他の CAM 耐性株と比較したところ、327 番目のアミノ酸変異を有する株は、2012-42 株のみであった。

7. AcrB の 327 番目のアミノ酸置換による AZM 低度耐性化機構の解析

AcrB 領域の 327 番目のアミノ酸置換が AZM 低度耐性化に関与しているかどうか検討するために、上述した第 2 章 - 【結果】 - 5 の形質転換株 (Rd_{42acr}) と 2011-70 株の *acr* 領域の DNA を同様の方法で *H. influenzae* Rd 株に導入した形質転換株 (Rd_{70acr}) を用いて解析した。得られた株の Acr 領域は DNA シークエンスによって確認した。Rd_{70acr} 株の CAM と AZM の MIC 値は、Rd_{42acr} 株と同様に親株と同じ MIC 値である 32 $\mu\text{g/mL}$ と 4 $\mu\text{g/mL}$ を示した。また、Rd_{70acr} 株の *acrB* 遺伝子転写量は、標準株の *H. influenzae* Rd 株と比較して、転写量が有意に高かった (Table 10) ($P < 0.05$)。

CLSI による薬剤感受性試験は、2 倍希釈系列で行われる。この方法は簡便で、再現性が高いが、薬剤濃度の設定間隔が広いため、薬剤排出ポンプによる薬剤排出量の詳細な変化をとらえることができないことが考えられる。そこで、AcrB のアミノ酸変異による微少の影響を調査するため、得られた形質転換株において、AZM 及び CAM の希釈段階 (AZM 1 $\mu\text{g/mL}$ 、CAM 2 $\mu\text{g/mL}$ ずつ) を細分化した薬剤感受性試験を行った (Table 10)。Rd_{42acr} 株の CAM の MIC 値は、Rd_{70acr} 株よりも 1.2 倍高く、さらに、AZM では、2.3 倍高い値を示した。従って、これらの結果より、AcrB の 327 番目のアミノ酸変異が AZM の薬剤感受性に影響することが明らかになった。

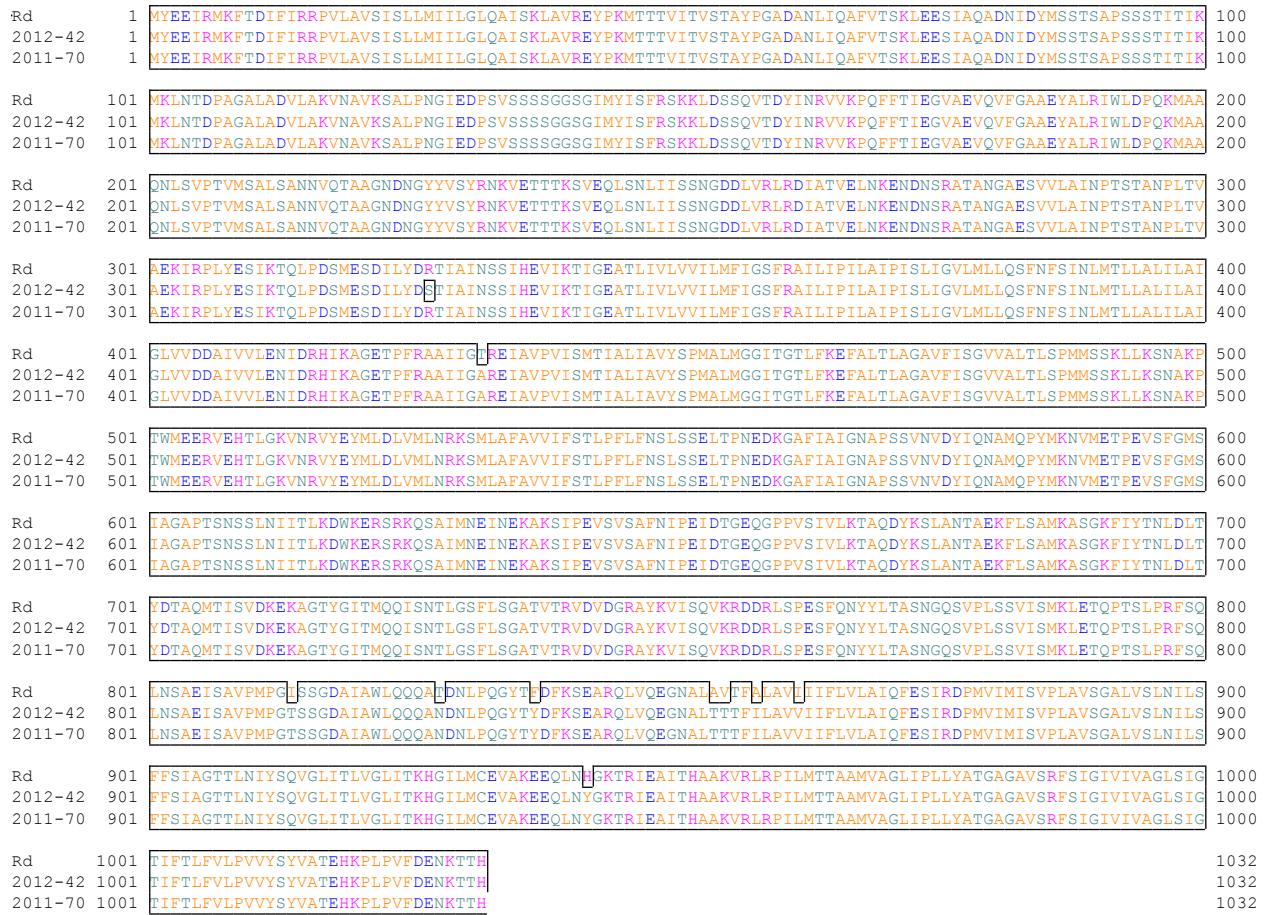


Fig. 9. Pairwise alignment of AcrB of *H. influenzae*

The AcrB regions of azithromycin (AZM) low-resistant strain 2012-42 (accession no. LC269307) and AZM-susceptible strain 2011-70 (LC269308) were compared.

The AZM low-resistant strain 2012-42 had the amino acid 327 substitution of AcrB.

Table 10. Detailed MICs of *H. influenzae* Rd and strains with *acr* mutations

Strain	Relative mRNA levels of <i>acrB</i> ^c	MIC (μg/mL)		Ratio ^b	
		CAM	AZM	CAM	AZM
Rd	0.82 ± 0.24	8	1	1	1
Rd _{42acr}	1.86 ± 0.35 ^a	30	8	3.8	8
Rd _{70acr}	1.45 ± 0.09 ^a	26	3.5	3.3	3.5

^a, $P < 0.05$ (Rd vs Rd_{42acr} and Rd vs Rd_{70acr})

^b, Ratio of each MIC level on the basis of *H. influenzae* Rd

^c, The transcription levels was calculated in comparison with the transcription level of *gyrB*. The measurement of transcription levels of *acrB* were performed at least three times independent experiments.

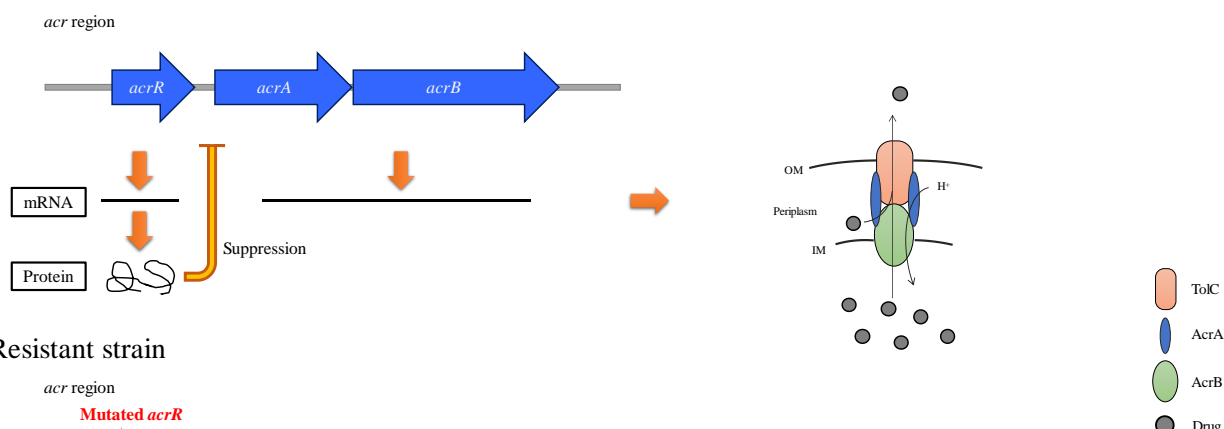
【 考 察 】

Macrolide 系薬は、小児にも使用可能であり、呼吸器感染症の起炎菌である *H. influenzae* や *Streptococcus pneumoniae*、*Mycoplasma pneumoniae* に抗菌活性を有し、組織移行性が良好な抗菌薬である。そのため、特に市中において macrolide 系薬は、原因菌不明時の気管支・肺などの下気道感染症に対する初期治療に繁用されている¹⁰²⁾。また、小児の急性副鼻腔炎に対する AZM の効果は、penicilline 系薬の AMPC/CVA と同等であることが示されている¹⁰³⁾。しかし、macrolide 系薬耐性 *S. pneumoniae* や *M. pneumoniae* が増加し、治療上問題となっている^{74, 75, 104, 105)}。さらに、第 1 章において、臨床分離された BLNAR では、AZM 小児細粒導入後 (2009 年)、2010 年を境に CAM 感受性率が低下し、耐性株が出現していることを明らかにした。そこで、本章では、CAM 耐性 BLNAR の耐性機構について解析した。

H. influenzae において以前報告されたことのある macrolide 系薬耐性機構である *mef(A)* 及び *erm(B)* ならびにリボソームタンパク 50S サブユニットを構成する L4 及び L22 上の変異は認められなかった。一方、CAM 耐性株では、薬剤排出ポンプ阻害剤である CCCP 及び PAβN 添加時において、CAM 及び AZM の MIC 値が低下し、*H. influenzae* の染色体性多剤排出ポンプである *acrB* 遺伝子発現量の増加が認められた。

Macrolide 系薬は、RND 型トランスポーターに属する AcrAB などの染色体性多剤排出ポンプによって排出されることが報告されている^{88, 93)}。AcrB 排出ポンプは、トランスポーター本体であり、膜融合タンパク質である AcrA、外膜貫通チャネル TolC と三者複合体を形成し機能している^{106, 107)} (Fig. 10)。AcrB は、3 量体を形成し、単量体あたり 12 本の膜貫通ヘリックスをもつことが知られている¹⁰⁸⁾。この排出システムは、細胞質だけでなく、ペリプラズムからも薬剤を排出すると言われている¹⁰⁸⁾ (Fig. 10)。AcrAB は、*acrR*、*acrA*、*acrB* を含むオペロンで構成され、*acrAB* は、AcrR によって負に調節されている¹⁰⁰⁾。*acr* オペロン全塩基配列の解析を行ったところ、全ての CAM 耐性株で *acrR* 配列中にフレームシフトを引き起こす塩基の挿入または欠損が存在し、ナンセンス変異が生じていた。さらに、2012-42 株の *acr* 領域を導入した Rd_{42acr} 株では、CAM の MIC は、2012-42 株と同じ値まで上昇し、*acrB* の発現量の増加も認められた。よって、臨床分離された CAM 耐性株では、薬剤排出ポンプ *acrAB* の調節因子である *acrR* 中の点変異により、負の調節機構が破綻し、排出ポンプが亢進することにより耐性化したことが明らかとなった (Fig. 10)。加えて、CAM 耐性株における *acrR* 中の塩基の挿入及び欠損によりナンセンス変異が起こる部位は菌株によって様々であった。つまり、*acrR* 領域は、抗菌薬の選択圧によって、変異が起こりやすいホットスポットであることを示唆している。これは、macrolide 系薬の繁用により薬剤の選択圧がかかると、容易に macrolide 耐性株が出現し得ることを強く示唆し、CAM 耐性株が市中での macrolide 系薬の使用量増加に伴い出現したという仮説を支持するものである。

A. Susceptible strain



B. Resistant strain

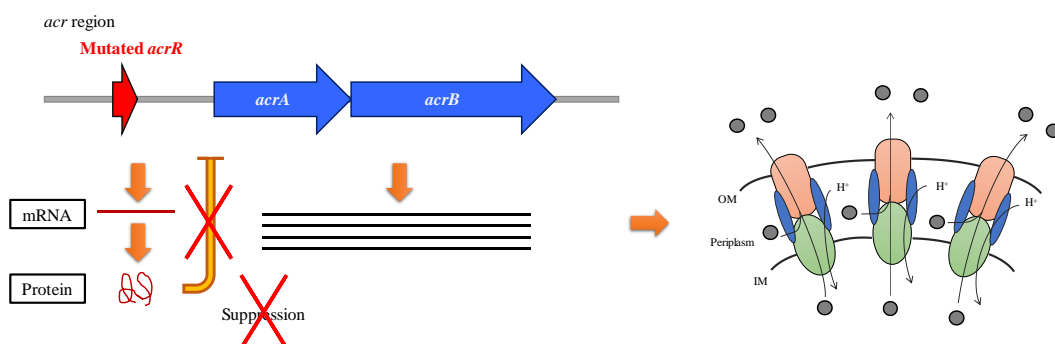


Fig. 10. Molecular mechanism of clarithromycin resistance in *H. influenzae*

(A) Susceptible strain; (B) Resistant strain; OM, outer membrane; IM, inner membrane

さらに、2012-42 株は、他の CAM 耐性株と異なり、AZM に低度耐性を示した。この AZM 低度耐性機構を解析したところ、AZM 低度耐性 2012-42 株は、AcrB の 327 番目のアミノ酸が arginine から serine に置換していた。この株の *acr* 領域を導入した *H. influenzae* Rd 株は、変異を持たない株の *acr* 領域を導入した株よりも AZM の MIC が高かったことから、AcrB の 327 番目のアミノ酸変異は AZM の排出に関与していることが強く示唆された。異物排出トランスポーターの阻害剤の開発研究において、阻害剤の感受性は、阻害剤結合部位の周辺のアミノ酸による、僅かな立体障害によって決まることが報告されている^{109, 110)}。そこで、CCTOP (Constrained Consensus TOPology prediction server, <http://www.cctop.enzim.ttk.mta.hu/>) を用いて、AcrB の 327 番目のアミノ酸変異が、AcrB 構造のどの部位に相当するかについて検討した¹¹¹⁾。AcrB は、過去の報告通り 12 本の膜貫通ヘリックスを持ち、327 番目のアミノ酸は細胞外に位置すると予測された。*E. coli* においても、AcrB の 327 番目のアミノ酸は、細胞外に位置することが過去に報告されている¹¹²⁾。つまり、細胞外におけるこのアミノ酸変異が、細胞質及びペリプラズムから AZM が排出される時に、基質特異性に影響を与えていることが示唆された。従って、AcrR のナンセンス変異に加え、AcrB に 327 番目のアミノ酸置換が生じることで AZM に低度耐性化することが明らかとなった。

薬剤排出ポンプは、細菌の薬剤耐性に関与するだけでなく、細菌の病原性に関与することが報告されている¹¹³⁾。このメカニズムとして、鉄の獲得系の関与や毒素に関与する分泌タンパク質の排出増加が報告されている⁸⁵⁾。従って、本章で解析した AcrAB 亢進株は、薬剤耐性に加えて、病原性の発現に影響する可能性がある。

本章では、臨床で分離されている CAM 耐性機構が *acrR* における点変異によるものであることを明らかにした。さらに、これらの株は *acrB* に点変異を獲得すると段階的に AZM に対しても耐性となり得ることを示した。これらはいずれも点変異により起こることから、macrolide 系薬の使用頻度の増加に伴い、これらの株が増加し得ると予測される。

第 3 章

小児由来株における fluoroquinolone 低感受性株の増加

【 背 景 】

第 1 章で BLNAR の macrolide 系薬の clarithromycin (CAM) 耐性株の出現と感受性率の低下を見出した。さらに、第 2 章でこれらの耐性化は、排出タンパク *acrAB* の負の調節因子である *acrR* 中に生じたナンセンス変異に起因することを明らかにした。 β -lactam 系薬耐性 *H. influenzae* に対しては、macrolide 系薬以外にも、強い抗菌活性と良好な組織移行性に加えて、広い抗菌スペクトルを有する fluoroquinolone 系薬が代替薬として使用できる。しかし、近年、成人の中で、特に高齢の患者から分離された *H. influenzae* において、fluoroquinolone 系薬の低感受性株や耐性株が β -lactam 系薬の耐性度に関係なく、検出されている¹¹⁴⁻¹¹⁸⁾。これは、成人の呼吸器感染症の治療において、fluoroquinolone 系薬の投与が広く行われていることが要因の一つとして考えられる。一方、小児に対しては、有効性及び安全性が十分に確認されていなかったことや関節毒性が報告されていたことから、これまでほとんど使用されてこなかった^{119, 120)}。2017 年 11 月現在、小児由来 fluoroquinolone 耐性 *H. influenzae* の報告はされていないが、近年の小児市中感染症起炎における各種薬剤耐性菌増加の影響を受け、本邦では、2010 年に tosylfloxacin (TFLX) の適応が小児に拡大された¹²¹⁾。TFLX は、幅広い抗菌活性と優れた抗菌力を有し、小児における肺炎及び中耳炎に対して、*in vitro* 及び *in vivo* で良好な成績を示している¹²²⁾。さらに、他の fluoroquinolone 系薬と比較して、非臨床試験での関節毒性が弱く、医療現場では以前から適応外使用として小児領域で使用されていた¹²³⁾。また、問題となる副作用が認められていないため、小児感染症領域の治療において、TFLX の臨床効果が期待されている¹²⁴⁾。しかし、この導入に伴い、小児に対する TFLX の使用が増加すると fluoroquinolone 系薬に対する低感受性化が進行し、耐性菌が出現する可能性がある。そのため、TFLX 導入に伴う菌株の薬剤感受性への影響が注目されている。

Fluoroquinolone 系薬は、細菌の DNA のトポロジジーを変化させる酵素である DNA ジャイレース及びトポイソメラーゼ IV に結合し、DNA 複製を阻害する¹²⁵⁾。そのため、DNA ジャイレースをコードする *gyrA* 遺伝子と *gyrB* 遺伝子及び、トポイソメラーゼ IV をコードする *parC* 遺伝子、*parE* 遺伝子の quinolone 耐性決定領域 (quinolone resistance-determining region: QRDR) にミスセンス変異が入り、薬剤の親和性が低下することで耐性化することが知られている¹²⁶⁾。変異の獲得様式は菌種によって異なり、*H. influenzae* の場合 *gyrA* 遺伝子の変異による GryA の 84 番目の serine から leucine (Ser84Leu) または tyrosine へのアミノ酸置換 (Ser84Tyr) と 88 番目の aspartic acid から glycine への置換 (Asp88Gly) が、初期の耐性化に寄与すると考えられている¹¹⁴⁾。

さらに、*parC* 遺伝子内に ParC の 84 番目の serine から arginine (Ser84Arg) と glutamic acid から lysine (Glu88Lys) へのアミノ酸置換をもたらす変異が入ることにより、ブレイクポイント以上に耐性化されている¹²⁷⁾。

Fluoroquinolone 耐性 *H. influenzae* の出現・増加を防ぐためには、臨床分離株の薬剤感受性の継続的な評価が不可欠である。実際、医療機関では、薬剤感受性測定が行われているが、いずれもブレイクポイントを基準とした耐性あるいは感受性の評価であるため、感受性の微細な変化を捉えることができない。

そこで、本章では、対象を BLNAR に限らず *H. influenzae* 全体に広げ、小児科由来株における fluoroquinolone 系薬に対する薬剤感受性の変化及び *gyrA* と *parC* 遺伝子の変異解析を行った。さらに、低感受性株を簡便に検出できる手法を確立した。

【 材 料 と 方 法 】

1. 使用菌株と培養条件

使用菌株は、2013 年から 2014 年の間に東京医科大学八王子医療センターの小児科患者から分離された計 96 株の *H. influenzae* を使用した。その内訳は、2013 年が 46 株、2014 年が 50 株であった。菌株の培養方法は、第 1 章 - 【材料と方法】 - 2 に記した方法で行い、菌株の保存は、10% skim milk (Becton Dickinson) 中に 10^{10} CFU/mL 以上の菌を懸濁し、使用時まで -80°C で保存した。

2. 菌種の同定と莢膜型の決定

菌種の同定と莢膜型の決定は、第 1 章 - 【材料と方法】 - 3 に記した方法で行った。

3. β -lactam 系薬耐性の分類

H. influenzae の β -lactam 系薬耐性の分類は、序論に示した Table 1 (p. 4) のように表現型に基づき行った。すなわち、BLNAS は、 β -lactamase 陰性で ABPC の MIC が $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以下、BLNAI は、 β -lactamase 陰性で ABPC の MIC が $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、BLNAR は、 β -lactamase 陰性で ABPC の MIC が $4\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以上、BLPAR は、 β -lactamase 陽性で AMPC/CVA の MIC が $4\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以下、BLPACR は、 β -lactamase 陽性で AMPC/CVA の MIC が $8\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以上とした。

β -lactamase 遺伝子の検出は、第 1 章 - 【材料と方法】 - 3 に記した方法で行った。

4. 薬剤感受性試験

使用薬剤は、ciprofloxacin (CPFX: Bayer)、levofloxacin (LVFX)、moxifloxacin (MFLX: Bayer)、norfloxacin (NFLX)、sitafloxacin (STFX: Daiichi-Sankyo)、TFLX を用いた。薬剤感受性試験は、第 1 章 - 【材料と方法】 - 5 に記した方法で行った。抗菌薬の感受性の判定基準は、Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) の breakpoint に準じ、CPFX の MIC が $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以下、LVFX の MIC が $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以下、MFLX の MIC が $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以下とした⁶⁷⁾。

5. GyrA と ParC の QRDR 領域におけるアミノ酸置換の解析

第 1 章 - 【材料と方法】 - 3 に記した方法で、GoTaq[®]Green Master Mix を用いて PCR を行い、*gyrA* 遺伝子と *parC* 遺伝子を増幅させた。プライマーは、Todd らのプライマーを用いた (Table 11)¹²⁸⁾。PCR 条件は、 95°C 、2 min の初期変性、 95°C 、15 sec の変性、 53°C 、15 sec のアニーリング、 72°C 、30 sec の伸長反応とし、25 サイクル行った。PCR 産物は、第 1 章 - 【材料と方法】 - 4 に記した方法でシーケンス反応を行い、塩基配列及びアミノ酸置換部位の解析を行った。

6. GyrA のアミノ酸置換 Ser84Leu の簡易検出法

GyrA における Ser84Leu のアミノ酸置換を簡便に検出するための PCR 法として、mismatch amplification mutation assay PCR (MAMA-PCR 法) を用いた¹²⁹⁾。

まず、前述の *gyrA* 遺伝子の塩基配列の解析の結果に基づいて、プライマーを設計した (Table 11)。PCR チューブに、Go Taq[®] Master Mix 5 μ L、Table 11 の F1 プライマー 10 pmol、F2 プライマー 5 pmol、R プライマー 10 pmol、PCR 試料 1 μ L を加えて、滅菌ろ過超純水にて全量を 10 μ L とした。PCR 条件は、95°C、2 min の初期変性、95°C、30 sec の変性、56°C、30 sec のアニーリング、72°C、30 sec の伸長反応の行程を 30 サイクル行った。PCR は、第 1 章 - 【材料と方法】 - 3 に記した方法で行った。PCR 産物が確認できた株は、野生株とし、PCR 産物が確認できなかった株は、変異株と判定した。

7. 統計解析

統計学的解析は、JMP software (SAS Institute) を用いて、 χ^2 検定により検定し、 $P < 0.05$ のときに統計学的に有意とした。

Table 11. Oligonucleotide primers used in this study

Target gene	Primer	Sequence (5' to 3')	Amplicon length (bp)	Description	Reference
<i>gyrA</i>	GyrA-F	CCGCCGCGTACTGTTCT	375	PCR, Sequence	128
	GyrA-R	CCATTGTGCTAAAAAGTGC		PCR, Sequence	128
	gyrA-w-F1	ATCACCCGCATGGTGACGC	255	MAMA-PCR	this study
	gyrA-w-F2	TAAATATCATCCTCAGGCGCATGC	230	MAMA-PCR	this study
	gyrA-w-R	GTTTGGCGAGAAATTGACGG		MAMA-PCR	this study
<i>parC</i>	ParC-F	TGGTTTAAACCCCGTTCA	370	PCR, Sequence	128
	ParC-R	AGCAGGTAAATATTGTGG		PCR, Sequence	128

【 結 果 】

1. 菌株の特徴とβ-lactam 耐性の分類

2013 年から 2014 年に分離された 96 株の小児科由来 *H. influenzae* の検体採取部位は、鼻腔内 67.7% (n = 65) が最も多く、次いで、喀痰 26.4% (n = 25)、咽頭 6.3% (n = 6) であった。また、莢膜型は全ての株が無莢膜型であった。

薬剤感受性試験より得られた結果に基づいて、β-lactam 耐性分類を行った (Table 12)。2014 年では、分離された *H. influenzae* の約 50%が BLNAR であり、2013 年よりも有意に増加していた ($P < 0.05$)。一方、BLPACR の分離率に変化は認められなかった。

Table 12. Comparison of β-lactam resistance phenotype

β-lactam resistance*	No. (%) of isolates		
	2013 n = 46	2014 n = 50	Total n = 96
BLNAS	15 (32.6)	11 (22.0)	26 (27.1)
BLNAI	15 (32.6)	5 (10.0)	20 (20.8)
BLNAR	13 (28.3)	27 (54.0)**	40 (41.7)
BLPAR	0 (0)	4 (8.0)	4 (4.2)
BLPACR	3 (6.5)	3 (6.0)	6 (6.3)

* β-lactamase-nonproducing ABPC-susceptible *H. influenzae* (BLNAS), MIC of ampicillin ≤ 1 μg/mL; β-lactamase-nonproducing ABPC-intermediate *H. influenzae* (BLNAI), MIC = 2 μg/mL; β-lactamase-nonproducing ABPC-resistant *H. influenzae* (BLNAR), MIC ≥ 4 μg/mL;

β-lactamase-producing ABPC-resistant *H. influenzae* (BLPAR), MIC of amoxicillin/clavulanic acid ≤ 4 μg/mL; β-lactamase-producing AMPC/CVA-resistant *H. influenzae* (BLPACR), MIC ≥ 8 μg/mL

** P value was calculated by χ^2 test

2. *H. influenzae* の fluoroquinolone に対する感受性

Fluoroquinolone 系薬の耐性率を明らかにするため CPFX、LVFX、MFLX、NFLX、STFX、TFLX の感受性を測定したところ、全ての株が感受性を示した。しかし、一般的な細菌検査室で行われている薬剤感受性試験では、感受性株の微細な MIC 値を捉えることができないため、特に成人に汎用される LVFX と小児に適応のある TFLX について詳細に解析した (Fig. 11)。2013 年において、LVFX の MIC₉₀ の値は 0.016 μg/mL を示したが、2014 年では 0.125 μg/mL を示し、MIC 値が上昇していた。2014 年では、LVFX の MIC ピークよりも 32 倍高い MIC 0.5 μg/mL の株が認められた。TFLX でも LVFX と同様に、MIC₉₀ の値が 0.008 μg/mL から 0.063 μg/mL ヘシフトしていた。さらに、LVFX の MIC 0.063 μg/mL 以上の株は、2013 年では 0 株 (0%) であったのに対し、2014 年には LVFX の MIC 値が 0.063 μg/mL 以上を示す明らかな低感受性株が 7 株 (14%) 認められた (Fig. 11)。この 7 株は全て ABPC の MIC 値が 4 μg/mL 以上を示す BLNAR であった (Table 13)。

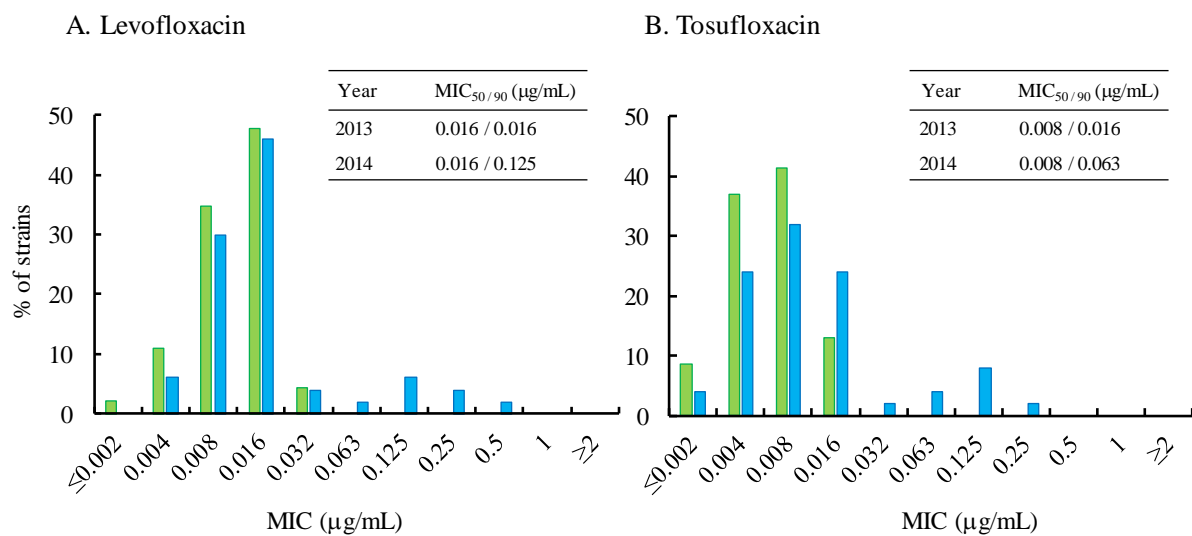


Fig. 11. MIC distribution of two fluoroquinolones in clinical *H. influenzae* isolates (A), Levofloxacin; (B), Tosufloxacin; Green bar, 2013; Blue bar, 2014; MIC_{50/90}, the values indicate the MICs (μg/mL) that inhibit the growth of 50% / 90% of strains.

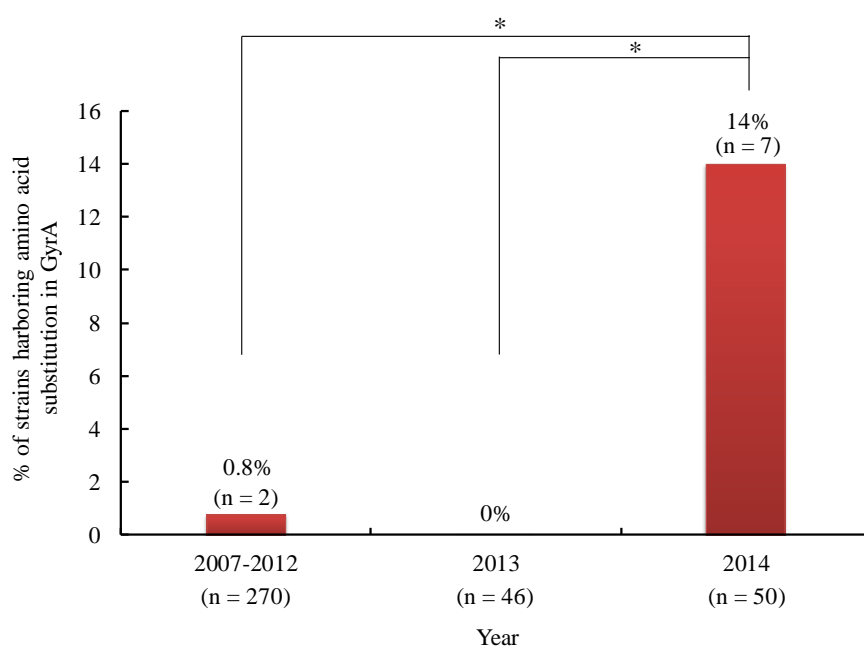


Fig. 12. Annual transition of clinical *H. influenzae* isolates harboring 84th amino acid substitutions in GyrA

The statistical analysis was performed by χ^2 test

* $P < 0.05$

Table 13. MICs for fluoroquinolones and amino acid substitutions in GyrA and ParC

Strain	Clinical department	MIC (µg/mL)					QRDR* substitution			β-lactam resistant** type
		LVFX	TFLX	CPFX	MFLX	NFLX	STFX	GyrA	ParC	
ATCC49247		0.008	0.004	0.004	0.008	0.032	≤0.002	-	-	BLNAI
Rd		0.008	0.004	0.004	0.004	0.032	≤0.002	-	-	BLNAS
2014-62	Anesthesiology	0.032	0.016	0.008	0.032	0.063	0.004	-	-	BLNAR
2014-46	Pediatrics	0.5	0.25	0.25	0.25	1	0.016	Ser84Leu	-	BLNAR
2014-68	Pediatrics	0.125	0.063	0.125	0.125	0.125	0.016	Ser84Leu	Asn138Ser	BLNAR
2014-72	Pediatrics	0.063	0.063	0.063	0.125	0.25	0.004	Ser84Leu	Ser133Ala, Asn138Ser	BLNAR
2014-74	Pediatrics	0.125	0.125	0.125	0.125	0.5	0.016	Ser84Leu	Asn138Ser	BLNAR
2014-88	Pediatrics	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25	0.008	Ser84Leu	-	BLNAR
2014-90	Pediatrics	0.25	0.125	0.125	0.25	0.25	0.032	Ser84Leu	-	BLNAR
2014-96	Pediatrics	0.25	0.125	0.125	0.25	0.5	0.016	Ser84Leu	-	BLNAR

* QRDR; quinolone resistance determining region

** BLNAR, MIC of ampicillin ≥ 4 µg/mL; BLNAI, MIC = 2 µg/mL; BLNAS, MIC ≤ 1 µg/mL

GyrA, DNA gyrase; ParC, topoisomerase IV; Ala, alanine; Asn, asparagine; Ser, serine; Leu, leucine; -, no substitution, LVFX; levofloxacin, TFLX; tosufloxacin, CPFX; ciprofloxacin, MFLX; moxifloxacin, NFLX; norfloxacin, STFX; sitafloxacin

3. GyrA 及び ParC の QRDR 領域におけるアミノ酸置換の解析

LVFX の薬剤感受性試験の結果から、MIC 0.016 $\mu\text{g/mL}$ をピークとした 1 峰性分布が示された (Fig. 11)。そこで、LVFX の MIC ピーク値から低感受性側へとシフトした MIC 0.032 $\mu\text{g/mL}$ を境界値と設定した。すなわち、0.032 $\mu\text{g/mL}$ 以下の株を感受性、0.063 $\mu\text{g/mL}$ から非感受性のブレイクポイントの一段階下の 2 $\mu\text{g/mL}$ までの株を fluoroquinolone 低感受性株と定義した。この分類の妥当性の検証ならびに耐性機構の解析のため、0.032 $\mu\text{g/mL}$ の株及び低感受性株の遺伝子解析を行った。

これらの株 ($n = 11$) の *gyrA* 及び *parC* 遺伝子における QRDR 領域塩基配列を決定し、GyrA 及び ParC のアミノ酸置換の解析を行った。その結果、MIC 0.063 $\mu\text{g/mL}$ 以上の全ての株 ($n = 7$) で、GyrA の 84 番目の serine から leucine への置換 (Ser84Leu) が認められた (Table 13)。GyrA の Ser84Leu を保有する低感受性株は、2013 年では認められなかったが、2014 年では、Ser84Leu 保有率が 7 株 (14%) と有意に増加していた (Fig. 12) ($P < 0.05$)。一方、LVFX の MIC 0.032 $\mu\text{g/mL}$ の株 ($n = 4$) では、GyrA の 88 番目の aspartic acid から tyrosine への置換、GyrA の 142 番目の glutamic acid から lysine への置換を有していた株がそれぞれ 1 株、置換を有していない株が 1 株であり、Ser84Leu は認められなかった。ParC では、アミノ酸置換を有する株が 3 株確認された。しかし、ParC のアミノ酸置換を有していた株は、fluoroquinolone 系薬に対する感受性に変化が認められなかった (Table 13)。

4. GyrA のアミノ酸置換 Ser84Leu の簡易検出法の構築

上述した結果から、本研究の定義に基づく fluoroquinolone 低感受性株は、全ての株が GyrA の Ser84Leu のアミノ酸置換を保有していることが明らかとなった。以前の報告で、このような株は ParC に変異が入ると耐性度がさらに上がることが明らかにされている^{52,55,127})。つまり、低感受性株は、耐性菌となる潜在性を持つため、これらの簡易検出法が耐性菌の動向解析において有用である。そこで、MAMA-PCR 法を用いた検出法を検討した。

非変異株のみ増幅可能なように、変異部位を 3' 末端になるように設計したセンスプライマー (*gyrA*-w-F1) と保存性の高い領域に設計したアンチセンスプライマー (*gyrA*-w-R) を用い、本研究で使用した臨床分離株計 96 株に対して PCR を行った。その結果、LVFX の MIC 値が低いにも関わらず増幅が認められない株が 4 株あった。そこで、これらの株について、シーケンス法で解析したところ、センスプライマーの領域に共通してアミノ酸置換を伴わない変異が認められた。これらの変異を有する株を検出するために、4 株の配列を基にして新たに *gyrA*-w-F2 を設計し、3 種類のプライマーを用いて再度検討した。その結果、Ser84Leu のアミノ酸置換を保有する株は、PCR 産物が認められず、Ser84Leu のアミノ酸置換を保有しない株では、PCR 産物が認められた (Fig. 13)。

LVFX の MIC 0.063 $\mu\text{g/mL}$ 以上と MIC 0.032 $\mu\text{g/mL}$ 以下の場合に分けて解析したところ、本手法で MIC 0.063 $\mu\text{g/mL}$ 以上の株を検出できる感度は、100%であり、特異度は 98.9%であった。MIC が 0.016 $\mu\text{g/mL}$ にも関わらず増幅が認められなかった株が 1 株あったが、この株はアンチセンスプライマーの領域に変異を持っていた。

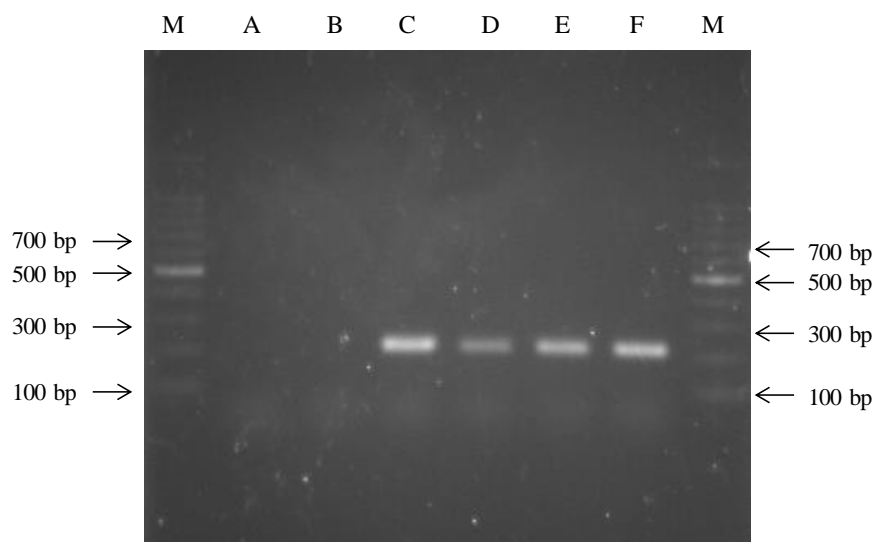


Fig. 13. Detection of amino acid substitution of Ser84Leu in GyrA by MAMA-PCR
Lane M, Molecular size marker; A, 2014-88 (Ser84Leu positive); B, 2014-46B (Ser84Leu positive); C, 2014-62 (Ser84Leu negative); D, 2014-110 (Ser84Leu negative); E, ATCC49247 (Ser84Leu negative); F, Rd (Ser84Leu negative)

【 考 察 】

第1章において、本邦では、BLNARの流行に加えて、その代替薬として使用できるCAMなどのmacrolide系薬にも低度耐性株が増加し、耐性株が出現していることを明らかにした^{48, 130)}。そのため、更なる代替薬としてfluoroquinolone系薬が治療上の選択肢として注目される。これまで小児の呼吸器感染症に対して、fluoroquinolone系薬は使用されていなかったが、本邦では、2010年にTFLXの適応が小児に拡大され、その臨床的効果が期待されている。しかし、すでに、成人由来株では、fluoroquinolone系薬耐性株の出現が報告されている^{55, 117, 118, 131, 132)}。すなわち、fluoroquinolone系薬の使用頻度が耐性株の出現に関与している可能性がある。従って、TFLX導入に伴う小児科領域での使用頻度の増加が、菌株の薬剤感受性に影響することが考えられる。

本章において、2013年、2014年に小児科から分離された*H. influenzae*に対するfluoroquinolone系薬の薬剤感受性を測定したところ、全ての株がブレイクポイント未満の感受性を示した。しかし、そのMICの幅は広く、明らかに低感受性側へ分布がシフトした株が分離された。そこで、LVFXのMICが0.063～2 µg/mLの株を低感受性株と定義し、遺伝子を詳細に解析したところ、LVFXのMIC 0.063 µg/mL以上の株では、全ての株でgyrA遺伝子の変異によるSer84Leuのアミノ酸置換が認められた。一方で、LVFXのMIC 0.032 µg/mL以下の株ではSer84Leuのアミノ酸置換は認められなかった。また、全ての株で、明らかに耐性に関与するParCのアミノ酸置換は認められなかった。つまり、既報にもあるように、fluoroquinolone系薬の感受性低下は、GyrAのSer84Leuのアミノ酸置換が大きく関与していることを示している^{114, 133)}。また、LVFXのMIC 0.063 µg/mLは低感受性のブレイクポイントとなることが示された。

グラム陽性菌である*Staphylococcus aureus*のキノロン耐性は、まず始めにParCに変異が生じ、次にGyrAに、そしてParCに再度変異が生じ、耐性度が段階的に上がることが知られている¹³⁴⁾。一方、以前の*Escherichia coli*でのquinolone耐性の研究から、グラム陰性菌のquinolone耐性化は、gyrAとparC遺伝子のQRDR領域に段階的に点変異が生じ、耐性度が上昇することが知られている^{114, 135, 136)}。*H. influenzae*においても、以前の報告でGyrAのアミノ酸置換に加え、ParCにもう一つアミノ酸置換が入るとブレイクポイント以上の耐性株となることが報告されている^{52, 55, 127)}。すなわち、GyrAのSer84Leuのアミノ酸置換は、fluoroquinolone系薬に対する耐性度上昇の初期のステップであると考えられる。このような株の出現・増加は、TFLXの小児適応拡大後に急増していたことから、抗菌薬の導入が関連している可能性がある。実際に、適応拡大以降、小児に対するTFLXの使用量はそれ以前と比較し増加している¹³⁷⁾。TFLXは、成人において、投与後2時間後の最高喀痰中濃度や気管支分泌物中濃度は、それぞれ0.31 µg/mL及び0.2～0.26 µg/mLである^{138, 139)}。小児用量では、さらに低くなる可能性があり、低感受性株が選択されたことが示唆される。また、これらの低感受性株は、TFLXの更なる使用によって、MIC付近の濃度で暴露され、より耐性化が

進行する可能性がある。加えて、低感受性株は、全ての株が BLNAR であったことから、BLNAR の多剤耐性化が徐々に進行していることを示している。BLNAR の多剤耐性化は、治療の選択肢が少ない小児や薬剤の相互作用や代謝過程などで問題が生じやすい高齢者において、使用できる薬剤の選択肢を狭めることになり、難治化する可能性がある。*H. influenzae* は、バイオフィルムを形成する株や細胞内侵入性を有する株も報告されており、細胞内移行性の高い macrolide 系薬や fluoroquinolone 系薬は重要な選択肢の一つである^{140,141)}。本邦において、CAM 低感受性株や耐性株が存在していることを考慮すると、小児の呼吸器感染症領域などに適応拡大された TFLX の治療上の役割は非常に重要であるため、薬剤感受性を維持する必要がある。

2017 年 11 月現在、PubMed 上でこのような *H. influenzae* の fluoroquinolone 低感受性株に関する疫学解析ならびに小児由来株の fluoroquinolone 耐性株の報告例はない。しかし、これまで感受性とされた株の中に GyrA の Ser84Leu のアミノ酸置換を持つ fluoroquinolone 系薬低感受性株が存在している可能性が考えられる。つまり、GyrA の Ser84Leu のアミノ酸置換保有株の動向を調査し、その現状を把握することは、更なる fluoroquinolone 耐性 *H. influenzae* の出現を防止することに有用であると考えられる。そこで、本章では、MAMA-PCR 法による *gyrA* 遺伝子変異の簡易的な検出法を開発した。本手法により、Ser84Leu のアミノ酸置換を有する株は、全て検出可能であった。従来のシーケンス法による変異部位の検出は、正確性が高い一方で、コストや時間や手間がかかる欠点がある。しかし、今回検討した MAMA-PCR 法は、シーケンス法よりもそれらの点で優れており、PCR は市中病院の検査室でも保有しているため、fluoroquinolone 系薬の低感受性株の簡易的なスクリーニングに適していると考えられる。

今後、小児では、TFLX などの fluoroquinolone 系薬の使用拡大により、耐性株の増加が懸念される。そのため、fluoroquinolone 耐性化の初期段階として考えられる GyrA の Ser84Leu のアミノ酸置換の保有状況について解析し、様々な地域の臨床分離株における fluoroquinolone 低感受性株の出現とその進行状況を把握する必要がある。それらの結果は、有効な血中濃度を保つための投与方法の考案や、より有効な治療薬への変更に繋がり、fluoroquinolone 耐性株出現の防止に有用であると考えられる。また、その際、本研究で開発した PCR 法による GyrA 変異の簡易検出法は、quinolone 系薬を適正に選択する上で有用なツールになると考えられる。

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

【 背 景 】

第 1 章から第 3 章で疫学解析を行ってきた医療施設において、2014 年に小児科患者の喀痰より macrolide 系薬の clarithromycin (CAM) 及び azithromycin (AZM) に対して、いずれも高度耐性 ($\text{MIC} \geq 64 \mu\text{g/mL}$) を示す株 (2014-102) が認められた。第 1 章及び第 2 章で分離・解析した *acrR* 遺伝子のナンセンス変異による CAM 耐性株では、CAM 及び AZM の MIC 値は、それぞれ $32 \mu\text{g/mL}$ と $4 \sim 8 \mu\text{g/mL}$ である。従って、*acrR* 変異による CAM 耐性株の耐性パターンとは明らかに異なっており、2014-102 株は、異なる耐性機構を保有する株であると考えられる。

H. influenzae においてこれまでに報告されている macrolide 耐性機構として、第 2 章で述べたように 2 つの耐性機構がある。第 1 は、macrolide 系薬の標的部位であるリボソームタンパク 50S サブユニットを構成する L4 及び L22 上のアミノ酸置換や 23S rRNA ドメイン V の変異による macrolide 系薬の結合能の低下である^{88,142)}。この変異は、macrolide 系薬高度耐性に関与することが知られ、CAM や AZM などの MIC 値が $64 \mu\text{g/mL}$ 以上の高度耐性を示す。第 2 は、一般的に *Streptococcus* 属などで知られている外来性遺伝子の *mef(A)* や *erm(B)* の獲得である。これらの菌種において、耐性遺伝子保有株は、14 員環、15 員環 macrolide 系薬に対して、MIC 値が $1 \sim >64 \mu\text{g/mL}$ の中等度から高度耐性を示す⁷⁹⁻⁸¹⁾。一方、*H. influenzae* で、以前報告された *mef(A)*、*erm(B)* 獲得株は、その約 25%が耐性を示すのみであり、表現型と一致していない⁸⁹⁾。そのため、*mef(A)* や *erm(B)* 獲得株の存在については未だ結論が出ていない⁹⁰⁻⁹²⁾。いずれの耐性株もその報告は非常に少なく、本邦ではこれまで分離例が報告されていない。

そこで、第 4 章では、macrolide 高度耐性株における菌株の特徴と耐性メカニズムの解析を行った。

【 材 料 と 方 法 】

1. 使用菌株と培養条件

使用菌株は、2014 年に東京医科大学八王子医療センターにおいて、小児科の患者の喀痰から分離された *H. influenzae* 2014-102 株を使用した。菌株の培養方法は、第 1 章 - 【材料と方法】 - 2 に記した方法で行った。臨床分離 *Streptococcus pneumoniae* 3684 株の培養は、血液寒天培地上で 37°C、18~24 hr で培養した。血液寒天培地は、5 mg/mL Bactro™ Yeast Extract 含有 brain heart infusion agar (BHI) に 5% defibrinated horse blood を加えて作成した。また、菌株の保存は、第 3 章 - 【材料と方法】 - 1 に記した方法で行った。

2. 菌種の同定と莢膜型の決定

菌種の同定と莢膜型の決定は、第 1 章 - 【材料と方法】 - 3 に記した方法で行った。さらに、16S rRNA 配列のシーケンス解析により菌種の同定を行った^{143, 144)}。シーケンス解析は、第 1 章 - 【材料と方法】 - 4 に記した方法で行った。16S rRNA のプライマーは、Table 14 に示した。

3. Multilocus sequence typing (MLST) 法による遺伝学的特徴の解析

第 1 章 - 【材料と方法】 - 6 に記した方法で行った。

4. β -lactam 系薬耐性の分類

H. influenzae の β -lactam 系薬耐性の分類は、第 3 章 - 【材料と方法】 - 3 に記した方法で行った。さらに、第 1 章 - 【材料と方法】 - 3 に記した方法で β -lactamase 遺伝子の検出を行った。

5. 薬剤感受性試験

使用薬剤は、amoxicillin (AMPC)、clavulanic acid (CVA)、ampicillin (ABPC)、sulbactam (SBT: Wako)、ceftriaxone (CTRX)、cefcape (CFPN)、meropenem (MEPM)、tebipenem (TBPM)、AZM、CAM、levofloxacin (LVFX)、tosufloxacin (TFLX)、minocycline (MINO)、ethidium bromide (EB) を用いた。排出ポンプ阻害剤は、Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) を用いた。排出ポンプ阻害剤の添加濃度は、0.75 μ g/mL で行った。薬剤感受性試験は、第 1 章 - 【材料と方法】 - 5 と第 2 章 - 【材料と方法】 - 3 に記した方法で行った。各種抗菌薬の感受性の判定基準は、第 1 章 - 【材料と方法】 - 5 と第 2 章 - 【材料と方法】 - 3 に記した方法で評価した。

6. 各種耐性遺伝子の検出とその解析

6-1. 染色体性多剤排出ポンプ遺伝子の解析

acrB 遺伝子の発現量及び *acrR* の塩基配列の決定は、それぞれ、第 2 章 - 【材料と方法】 - 4 と 5 に基づいて行った。

6-2. Macrolide 耐性遺伝子及び変異の検出 [*mef(A)*、*erm(B)*、L4、L22、23S rRNA]

mef(A) と *erm(B)* の検出及び L4 と L22 の変異の解析は、第 2 章 - 【材料と方法】 - 2 に基づいて行った。また、23S rRNA の変異の解析は、第 1 章 - 【材料と方法】 - 3 に記した方法で、GoTaq®Green Master Mix を用いて PCR により、遺伝子を増幅させた。プライマーは、Clark らの primer を用いた (Table 14)⁹⁸⁾。PCR 条件は、94°C、2 min の初期変性、94°C、30 sec の変性、50°C、30 sec のアニーリング、72°C、1 min の伸長反応とし、30 サイクル行った。PCR 産物は、第 1 章 - 【材料と方法】 - 4 に記した方法でシーケンス反応を行い、塩基配列の解析を行った。

6-3. *mef(A)* 遺伝子の周辺領域の塩基配列の解析

mef(A) 周辺領域を Table 14 の各種 primer を使用し、PCR 及びシーケンス反応を第 1 章 - 【材料と方法】 - 3 と 4 に記した方法で行った。PCR 条件は、95°C、2 min の初期変性、95°C、30 sec の変性、55°C、30 sec のアニーリング、72°C、2.5 min の伸長反応とし、25 サイクル行った。

また、同様に tetracycline 耐性遺伝子である *tet(M)* の検出を Table 14 の primer を用いて第 1 章 - 【材料と方法】 - 3 に記した方法で PCR を行った¹⁴⁵⁾。PCR 条件は、94°C、2 min の初期変性、94°C、15 sec の変性、54°C、15 sec のアニーリング、72°C、45 sec の伸長反応とし、25 サイクル行った。さらに、その周辺領域の塩基配列の解析を上記の *mef(A)* 周辺領域の PCR 増幅産物と Table 14 の primer を用いて、第 1 章 - 【材料と方法】 - 4 に記したシーケンス法で行った。

mef(A) と *tet(M)* 遺伝子の塩基配列は、NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.Gov/Blast.cgi>) を用いて、相同性検索を行った。

Table 14. Oligonucleotide primers used in this study

Primer	Sequence (5' to 3')	References
16S rRNA 8UA	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	143, 144
16S rRNA 1485B	TACGGTTACCTTGTTACGAC	143, 144
23S rRNA-F	CGGCGGCCGTAAC TATAACG	98
23S rRNA-R	GATGTGATGAGCCGACATCG	98
mef-up	ACCAAAAGCCACATTGTGGG	this study
mef-down	TCCTGTCTATAATCGCATGC	this study
mef-F	TGTGCTAGTGGATCGTCATGA	97
mef-F1	TTTTATAGCGGTGTGCAAAC	this study
mef-R	TGCAATCACAGCACCCAATA	97
tetM-up	GTACCCAGTTTAAGAATACC	this study
tetM-F	GTGACGAACTTTACCGAATC	145
tetM-F1	CTTTCTTTCTTAGGGAAAGT	this study
tetM-down	ATAACTATCTCCTCCTTTAC	this study
tetM-R	ATCGTAGAAGCGGATCACT	145
tetM-R1	AAAAC TTTCCGCAAAGTTC	this study
MYY03410-F	AATATGGTTTCTTGTTAAAT	this study
MYY1868-F	AATTGGTGTATCTTATAGTG	this study
MYY1870-F	CCGTTTCATATTTACCATTTTC	this study
MYY1870-R	CTCCTCGACAAGTTCAAATAC	this study
MYY1872-F	AACTTGCCTATATTCCCCAG	this study
MYY1872-F2	TAAAGTATTTGGGGATAAGG	this study
MYY1872-R	GGATGTTATATCTACCCATG	this study

7. *mef(A)* 遺伝子領域の伝達実験

Macrolide 耐性遺伝子である *mef(A)* を保有する *H. influenzae* 2014-102 株と臨床分離 *Streptococcus pneumoniae* 3684 株をドナー株として用いた。また、rifampicin (RFP: Wako) 耐性の *H. influenzae* Rd と臨床分離株 *H. influenzae* 2007-24 株をレシピエント株として用いた。レシピエント株は、sBHI broth で 24 hr の培養後、25 µg/mL の RFP 含有チョコレート寒天培地上に塗抹し、24~48 hr、微好気条件下の培養で発育した株を用いた。

ドナー株とレシピエント株の単離したコロニーを sBHI broth に懸濁し、24 hr 培養を行った。*S. pneumoniae* の培養は、Todd-Hewitt broth (THB: Becton Dickinson) で行った。培養後、sBHI の 1/10 倍量のドナー株とレシピエント株を sBHI に添加し、8~10 hr の培養を行い、 $10,000 \times g$ で 5 min の遠心分離し、集菌した 100 µL の菌液を CAM 16 µg/mL 及び RFP 25 µg/mL 含有チョコレート寒天培地と薬剤非含有チョコレート寒天培地に塗抹した。伝達頻度は、薬剤含有チョコレート寒天培地に発育したコロニー数を薬剤非含有チョコレート寒天培地に塗抹した際に発育したコロニー数で除することにより算出した。

8. *mef(A)* 遺伝子領域の脱落实験

遺伝子の脱落实験は、*H. influenzae* 2014-102 株を用いて 2 つの方法を用いて行った¹⁴⁶⁾。第 1 は、MIC 濃度の EB を含む sBHI 中で 37°C、24 hr の培養を行った。第 2 は、同様の培地を用いて、42°C、24 時間の培養を行った。培養した菌株は、sBHI 寒天培地上に塗抹した。塗抹後、1,000 コロニーについて、選択培地である ABPC (32 µg/mL)、CAM (32 µg/mL)、MINO (4 µg/mL) のいずれかを含有する sBHI 寒天選択培地上に継代した。薬剤耐性遺伝子の脱落は、選択培地上への発育と *mef(A)* 遺伝子の増幅によって判定した。PCR は、第 2 章 - 【材料と方法】 - 2 に基づいて行った。これらの実験は独立して 2 回以上行った。

9. 塩基配列の登録

H. influenzae 2014-102 株が保有する *mef(A)* 周辺領域の塩基配列は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) に登録を行った (accession number LC16884)。

【 結 果 】

1. Macrolide 高度耐性 *H. influenzae* 2014-102 株の特徴

H. influenzae 2014-102 株の薬剤感受性を調べたところ、macrolide 系薬である CAM と AZM の MIC 値は、それぞれ CAM MIC 128 $\mu\text{g/mL}$ 、AZM MIC 64 $\mu\text{g/mL}$ であり、高度耐性を示した (Table 15)。また、macrolide 系薬以外の薬剤感受性は、penicillin 系薬に対して高度耐性を示し、加えて、MINO に対して中等度耐性を示した。一方、 β -lactamase 阻害剤含有 penicilline 系薬と cephem 系薬を含む他の β -lactam 系薬及び quinolone 系薬には感受性を示した。

第 1 章、3 章で用いた P6 遺伝子による菌種同定法では、稀に *H. influenzae* の近縁種である *H. haemolyticus* も陽性と判断される可能性が指摘されている¹⁴⁷⁾。そこで、16S rRNA 配列のシークエンス解析により詳細に菌種同定を行ったところ、*H. influenzae* の type strain と 100%の相同性を示した。また、この株は MLST 法により ST478 に分類された。莢膜型は無莢膜型であった。

2. Macrolide 耐性遺伝子の検出とその解析

Macrolide 耐性に関与する排出タンパクの影響を調べるために、排出ポンプ阻害剤である CCCP を添加し、MIC 値を測定した。その結果、CCCP の存在下における CAM と AZM の MIC 値は低下した (Table 15)。そこで、この株の macrolide 系薬耐性化機構について解析を行った。その結果、多剤排出ポンプ遺伝子である *acrAB* の発現量を調節している *acrR* のナンセンス変異や *acrAB* の発現量の上昇は認められなかった。また、リボソームタンパク L4 及び L22 上のアミノ酸置換や 23S rRNA の変異は認められなかった。そこで、外来性の macrolide 耐性遺伝子である *mef(A)* 及び *erm(B)* を PCR で検出したところ、*erm(B)* は検出されなかったが、macrolide 排出ポンプをコードする *mef(A)* が検出された。

3. *mef(A)* 周辺領域の解析

PCR で検出された DNA が *mef(A)* であることを確認するために、*mef(A)* 周辺領域の塩基配列を解析した。その結果、*mef(A)* 周辺領域の塩基配列は、*Streptococcus* 属の *mef(A)* と相同性が最も高かった (Fig. 14)。この株の *mef(A)* 遺伝子と *Streptococcus* 属の *mef(A)* 遺伝子は、100%の相同性を示した。さらに、*mef(A)* 遺伝子の近傍領域に *tet(M)* 遺伝子が存在していた。そこで、2014-102 株の *tet(M)* から *mef(A)* 遺伝子までの全領域を解析したところ、その領域の全長は、6,445 bp であった (Fig. 15)。BLAST 検索の結果、*S. pneumoniae* ST556 株 (Genbank accession no. CP003357) や *S. pneumoniae* Taiwan 19F-14 株 (Genbank accession no. CP000921) の Tn916 family transposon (~20 kb) 上の塩基配列と 99%の相同性を示した (Fig. 15)¹⁴⁸⁾。また、この領域中には、ABC (ATP

binding cassette) 型の異物排出ポンプである *msr(D)* や 4 つの機能未知の遺伝子が存在していた (Fig. 15)。

Table 15. Comparison of MICs ($\mu\text{g/mL}$) against *H. influenzae* strains 2014-102 and Rd

Antimicrobial agent	2014-102	Rd
Ampicillin	64	0.25
Ampicillin/Sulbactam	1	0.25
Amoxicillin	64	0.25
Amoxicillin/Clavulanic acid	0.5	0.25
Cefditoren	≤ 0.063	≤ 0.063
Cefotaxime	≤ 0.063	≤ 0.063
Meropenem	≤ 0.063	≤ 0.063
Clarithromycin	128	8
Clarithromycin with CCCP	64	4
Azithromycin	64	0.5
Azithromycin with CCCP	16	0.5
Levofloxacin	0.016	0.004
Tosufloxacin	0.004	0.004
Minocycline	8	0.13
Ethidium bromide	2	1

CCCP, carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone

Fig. 14. Comparison of *mef*(A) in *H. influenzae* 2014-102 with reference sequences of various bacteria.

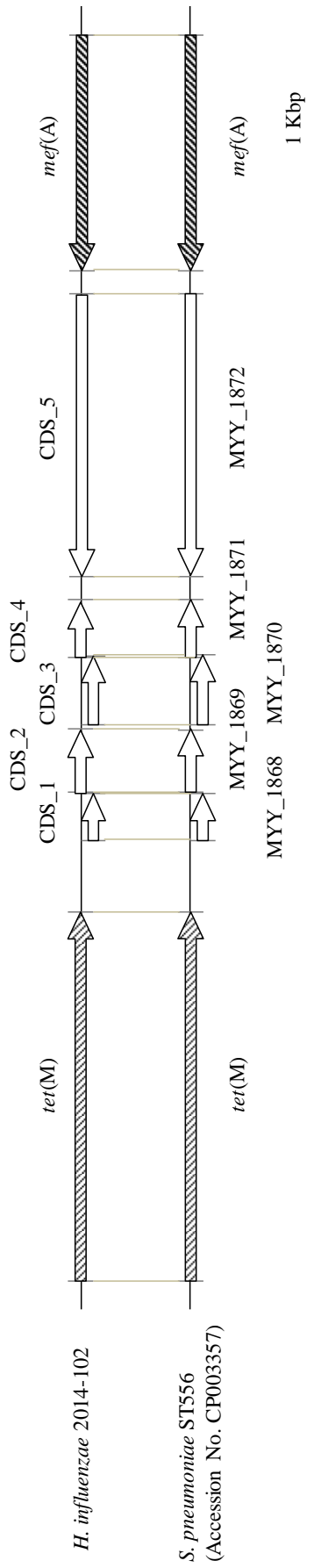


Fig. 15. Gene organization of flanking regions of the *tet(M)* and *mef(A)* genes

The area between two lines shows a gene with high homology. *H. influenzae* 2014-102, *mef(A)* and *tet(M)*-positive strain (Accession No. LC168847); *S. pneumoniae* ST556, reference sequence (Accession No. CP003357).

The vertical flight sandwiching the arrow is the identical arrangement.

MYY_1868 and CDS_1, hypothetical protein; MYY_1869 and CDS_2, ImsC-like protein; MYY_1870 and CDS_3, hypothetical protein; MYY_1871 and CDS_4, hypothetical protein; MYY_1872 and CDS_5, ABC transporter *msr(D)*.

4. *mef(A)* 遺伝子領域の伝達

mef(A) と *tet(M)* 遺伝子が菌種及び菌株間で伝達するかどうかを解析するために、*H. influenzae* Rd 株や臨床分離 *H. influenzae* 2007-24 株、*S. pneumoniae* 3684 株を用いて、遺伝子伝達実験を行った。その結果、菌種及び菌種間における *mef(A)* と *tet(M)* 遺伝子の伝達頻度は、 10^{-9} 未満であり、伝達株は得られなかった (Table 16)。

Table 16. Transfer frequency of *mef(A)* and *tet(M)*

Donor	Recipient	Frequency
<i>H. influenzae</i> 2014-102	<i>H. influenzae</i> Rd	$<9.8 \times 10^{-10}$
	<i>H. influenzae</i> 2007-24	$<1.1 \times 10^{-9}$
<i>mef(A)</i> -harboring <i>S. pneumoniae</i> 3684	<i>H. influenzae</i> Rd	$<5.9 \times 10^{-10}$
	<i>H. influenzae</i> 2007-24	$<7.4 \times 10^{-10}$

5. *mef(A)* 遺伝子領域の脱落

本遺伝子がプラスミド性であれば、EB 処理または熱処理にて脱落する可能性がある¹⁴⁶⁾。そこで、*H. influenzae* 2014-102 株が保有していた *mef(A)* 周辺領域の耐性遺伝子の脱落実験を行った。その結果、MIC 濃度の EB 処理及び 42°C の熱処理では、*mef(A)* 周辺領域の耐性遺伝子の脱落は認められなかった。

従って、*mef(A)* がプラスミド上でなく、細菌の染色体 DNA 上に存在していることが示唆された。

【 考 察 】

本章では、第3章の疫学解析で用いた臨床分離 *H. influenzae* 中に見出された CAM と AZM に高度耐性 ($\text{MIC} \geq 64 \mu\text{g/mL}$) を示す株 (2014-102) の macrolide 耐性メカニズムの解析を行った。

2014-102 株では、*mef(A)* 遺伝子が認められ、それ以外の macrolide 耐性に関与する遺伝子や変異は認められなかった。そのため、*mef(A)* 遺伝子が macrolide 耐性に関与していることが強く考えられた。*mef(A)* 遺伝子の獲得は、*Streptococcus* 属の代表的な macrolide 耐性化機構の1つである。この耐性因子を獲得すると、*S. pneumoniae* では、CAM や AZM の MIC 値が $1 \sim 4 \mu\text{g/mL}$ を示すとされている¹⁴⁹⁾。しかし、2014-102 株の CAM や AZM の MIC 値は、 $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ と高値を示した。これは、*H. influenzae* が、グラム陰性菌であるため、元来、CAM 及び AZM の MIC 値が *S. pneumoniae* よりも高い値を示すことが原因であると考えられる¹⁴⁹⁾。実際に、CLSI に記載されている薬剤感受性標準株の CAM の MIC 値は、*S. pneumoniae* (ATCC49619 株) で $0.03 \sim 0.12 \mu\text{g/mL}$ 、*H. influenzae* (ATCC49247) で $4 \sim 16 \mu\text{g/mL}$ であり、極めて高い値を示している¹⁵⁰⁾。

さらに、2014-102 株は、penicillin 系及び tetracycline 系薬にも耐性を示す多剤耐性株であった。この penicillin 耐性や tetracycline 耐性は、それぞれ、 β -lactamase 遺伝子である *bla*_{TEM-1} の獲得と tetracycline 耐性遺伝子である *tet(M)* の獲得に起因していた。*mef(A)* を含むこれらの耐性遺伝子の遺伝子脱落実験を行ったところ、脱落は認められなかった。加えて、*mef(A)* から *tet(M)* 遺伝子までの周辺領域の塩基配列を解析したところ、*S. pneumoniae* の Tn916-family transposon 上の配列と 99% の相同性を示した。Tn916 は、*Enterococcus faecalis* など主にグラム陽性菌から発見された tetracycline 耐性遺伝子を保有するトランスポゾンであり、接合伝達によって、細菌の染色体に転移することが知られている¹⁵¹⁾。従って、これらの耐性遺伝子は、トランスポゾンによって、外来から移入し染色体に導入され、安定に存在していると考えられた。

上気道の常在菌である *S. pneumoniae* は形質転換能を有しているため、*mef(A)* 遺伝子は菌株間で水平伝播することが知られている^{152, 153)}。また、*H. influenzae* も形質転換能を有しているため、外来環境中に存在する菌種から DNA 分子を効率的に取り込むことが知られている¹⁵⁴⁾。実際に、各種遺伝子解析の結果から、 β -lactam 系薬耐性に関与する PBP3 をコードする *ftsI* 遺伝子が、*H. haemolyticus* やその近縁菌種から水平伝播したことが示唆されている^{59, 153, 155)}。つまり、*H. influenzae* と *S. pneumoniae* は、グラム染色性が示すように遺伝的に大きく異なる細菌種であるが、どちらの菌も形質転換能を有し、常在菌として同じ部位に存在している。また、この菌株の遺伝子型である ST478 は、MLST.Net (<http://www.mlst.net>) に登録された報告より、中耳や気管支から分離されているため、一般的な常在菌あるいは気道感染症起炎菌であり、*S. pneumoniae* と接触する可能性がある。さらに、*S. pneumoniae* は、autolysin によって、病原性因子や DNA を放出することが知られていることから、*H. influenzae* が *S.*

pneumoniae から放出された DNA を取り込むことが予測できる^{156, 157)}。それゆえ、*S. pneumoniae* やその周辺に存在する菌種から *H. influenzae* へ *mef(A)* 遺伝子と *tet(M)* 遺伝子が伝達したことが強く示唆された。しかし、*in vitro* での遺伝子伝達実験では、*H. influenzae* 間及び *H. influenzae* と *S. pneumoniae* 間での水平伝播は認められなかったため、*in vivo* での耐性遺伝子の伝達の可能性については今後の研究課題になると考えられる。

これまでの研究より、*H. influenzae* において、外来遺伝子の獲得は、*tet(M)* 遺伝子を単独で有する株がすでに報告されており、表現型も一致している¹⁵⁸⁾。一方で、*mef(A)* 遺伝子を保有する *H. influenzae* の存在は、その約 25% が耐性を示すのみであり、表現型と一致していない⁸⁹⁾。そのため、その存在については様々な議論がされており、否定的な報告も存在している⁹⁰⁻⁹²⁾。実際に、*mef(A)* の存在を最初に報告した Robert らは PCR による同定のみで塩基配列を解析していない。加えて、彼らの手法を再検討したところ、使用するプライマーならびに PCR に用いる酵素の違いにより結果が一致しないことがあった。しかし、本章では世界において初めて、両方の遺伝子を獲得した *H. influenzae* を分離し、詳細な解析より、その存在を明らかにした。

acrR 変異による CAM 耐性株は、第 1 章及び第 2 章で示したように、全て BLNAR であり、PBP3 に変異を有する株であった。しかし、2014-102 株は、外来の β -lactamase 遺伝子を獲得した BLPAR であり、外来から penicillinase 産生の耐性遺伝子を獲得した株である。*H. influenzae* は、形質転換能が高く外来遺伝子を獲得しやすいことが知られているため、外来遺伝子を獲得しやすい株が存在することが考えられる¹⁵⁴⁾。本邦では、外来の β -lactamase 遺伝子を獲得した BLPAR は、約 5 ~ 10% と分離頻度は低いが、米国では約 30% と高頻度に分離されている⁵³⁾。これは、 β -lactam 系薬の使用法に起因すると言われている。本邦では、これまで cephem 系薬が繁用されていたため、BLPAR の分離頻度が低い。一方、米国では、penicillin 系薬が繁用されていたため、BLPAR が多いと考えられている。近年、世界的に薬剤耐性対策が課題とされていることから、本邦でも、cephem 系薬の安易な使用の見直しが行われており、penicillin 系薬の使用頻度が上がってきた。従って、今後は、外来遺伝子を獲得した耐性菌についても検討する必要がある。さらに、近年では、この BLPAR に加えて、PBP3 変異を獲得した BLPACR の増加が報告されている。このような外来遺伝子の獲得や、第 3 章で示したような fluoroquinolone 系薬に低感受性化しつつある現状を踏まえると、今後、*H. influenzae* の多剤耐性化が危惧される。従って、このような株の動向について、注視していく必要がある。

【 総 括 】

本研究では、新規抗菌薬導入に伴う *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章では、2007年から2012年に分離された BLNAR の各種薬剤感受性の変化についての調査研究を行った。その結果、carbapenem 系薬や fluoroquinolone 系薬は、良好な感受性を維持している一方で、macrolide 系薬の CAM に低度耐性を示す株が増加し、耐性株も出現していることを明らかにした。CAM 低度耐性化は、AZM 小児細粒が導入された時期と一致しており、抗菌薬使用量の増加が *H. influenzae* に影響し、低度耐性株が選択されたことが示唆された。

第2章では、臨床分離 BLNAR 株における CAM 耐性機構及び AZM 低度耐性機構を解析した。CAM 耐性は、薬剤排出ポンプ *acrAB* の調節因子 *acrR* のナンセンス変異に起因する、*acrAB* の転写量の増加によることを明らかにした。また、*acrR* の変異部位は様々であり、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章では、TFLX の小児適応拡大後に耐性化の初期段階である GyrA の Ser84Leu を保有する LVFX 低感受性株が増加していることを明らかとした。また、これらの菌株は、全て BLNAR であり、多剤耐性傾向にあることが明らかとなった。同時に、本菌のサーベイランス研究において、quinolone 系薬を適正に選択する上で有用なツールとなり得る低感受性株の簡易検出法を開発した。

第4章では、2014年に小児科患者の喀痰から分離されたβ-lactamase 産生菌株中に、*mef(A)* 及び *tet(M)* を内包する *S. pneumoniae* の Tn916-family transposon 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。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)* 遺伝子を獲得したことが強く示唆された。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。

近年、新規抗菌薬の開発が減少している中で、世界的に薬剤耐性 (AMR; Antimicrobial resistance) 感染症が拡大し、治療の難治化だけでなく、公衆衛生及び社会経済に重大な影響を与えている。そのため、グローバルな AMR 対策が推進されている。本邦における AMR の拡大は、広域スペクトルを有する経口 cephem 系薬、fluoroquinolone 系薬、macrolide 系薬の不適切な使用と考えられている^{159, 160)}。実際に、本研究では、AZM や TFLX といった新規抗菌薬の導入に伴う *H. influenzae* を取り巻く環境の変化が、本菌の薬剤感受性に影響し、fluoroquinolone 系薬や macrolide 系薬に対する低感受性株や低度耐性株の増加と、macrolide 系薬耐性株の出現をもたらして

いる可能性を示した (Fig. 16)。本研究で見出された感受性低下株は、全て遺伝子変異に起因する株であり、薬剤の選択圧により出現したと考えられる。これらの薬剤は、いずれも広域スペクトルを持つ抗菌薬であるため、本研究は安易に広域スペクトルの抗菌薬を使用することで、低感受性株や低度耐性株が増加し、耐性株が出現し得ることを分子レベルで示した。

本邦では、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、治療上深刻な問題となる。特に小児領域では、適応可能な薬剤が少なくその影響は大きい。従って、小児領域の呼吸器感染症治療において、抗菌薬を使用する際には、耐性菌の出現抑制も考慮し、parmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD) などを活用した、より適正な薬剤の選択や投与量の設定が必要である。

以上のことより、本研究で得られた *H. influenzae* の経時的な薬剤感受性のサーベイランスや各種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。

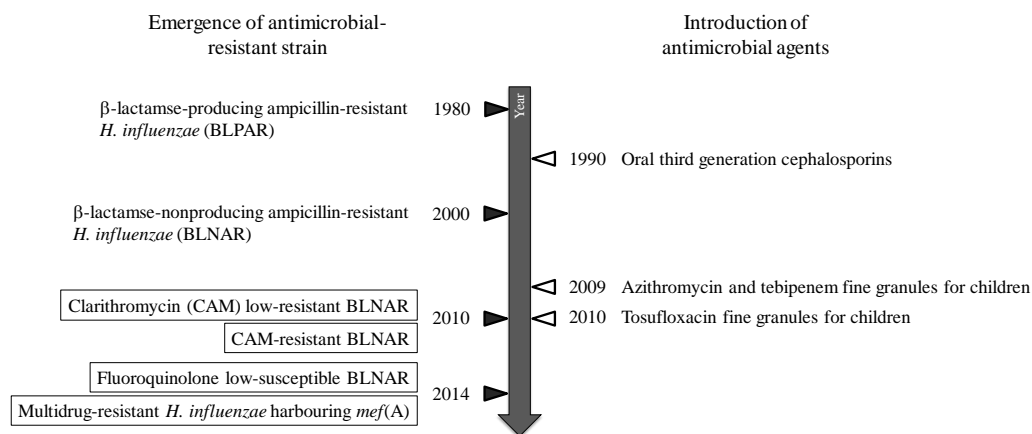


Fig. 16. Timeline of emergence of antimicrobial resistance strain and introduction of agents in pediatric field

【 謝 辞 】

本研究を行う機会を与えて頂き、本研究の遂行及び論文を作成するにあたり終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師、東京薬科大学 病原微生物学教室 野口 雅久 教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行及び論文を作成するにあたり、終始熱心な御指導、御助言を賜るとともに、様々な面で数多くの御力添えを賜り、大変お世話になりました東京薬科大学 病原微生物学教室 輪島 丈明 助教に心より厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究を行うにあたり、学部生時より種々の御助言と御協力を頂き、大変お世話になりました東京薬科大学 病原微生物学教室 中南 秀将 講師に深く御礼申し上げます。

臨床検体の提供にご協力頂きました東京医科大学八王子医療センターの藤井 毅 先生、牛尾 方信 先生を始めとする感染対策チームの諸先生方に深く感謝の意を表します。

また、本研究を行うにあたり御協力頂きました東京薬科大学 病原微生物学教室 中瀬 恵亮 助手に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、共に研究に励み、様々な面で多大な御協力を頂き、加えて、研究以外の面においても大変お世話になりました東京薬科大学 病原微生物学教室 卒論生 鹿島 千尋 氏、中村 友香 氏、柳澤 友希 氏、鈴木 雅恵 氏、落合 祥子 氏、山田 翔伍 氏、田中 愛海 氏、藤井 仁美 氏に深く御礼申し上げます。

また、本研究を行うにあたり御協力頂きました東京薬科大学 病原微生物学教室 湯澤 優奈 氏、佐伯 成美 氏を始めとする東京薬科大学病原微生物学教室諸氏に心より感謝いたします。

本研究は、公益社団法人 日本薬学会の研究奨励支援事業である日本薬学会長井記念薬学研究奨励金の支援を受けたものであり、大学院での研究生活における経済的支援を賜り、本事業に心より感謝申し上げます。

最後に、温かく応援して頂きました家族や友人に心より感謝いたします。

【 引 用 文 献 】

- 1) 吉田眞一, 柳 雄介, 吉開泰信. 戸田新細菌学 改訂 33 版. (2007).
- 2) Rennie R, Gordon T, Yaschuk Y, Tomlin P, Kibsey P, Albritton W. Laboratory and clinical evaluations of media for the primary isolation of *Haemophilus* species. *J Clin Microbiol*, **30**, 1917-1921 (1992).
- 3) Partric R. Murray EJB, James HJ, Marie LL, Michael AP. Manual of Clinical microbiology. 9th Edition. Volume 1. **1**, (2007).
- 4) Watanabe H, Hoshino K, Sugita R, Asoh N, Watanabe K, Oishi K, Nagatake T. Possible high rate of transmission of nontypeable *Haemophilus influenzae*, including beta-lactamase-negative ampicillin-resistant strains, between children and their parents. *J Clin Microbiol*, **42**, 362-365 (2004).
- 5) Ito M, Hotomi M, Maruyama Y, Hatano M, Sugimoto H, Yoshizaki T, Yamanaka N. Clonal spread of beta-lactamase-producing amoxicillin-clavulanate-resistant (BLPACR) strains of non-typeable *Haemophilus influenzae* among young children attending a day care in Japan. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, **74**, 901-906 (2010).
- 6) Uno H, Okuma C, Fujiwara M, Kitamura T. A case of a 5-weeks-old baby with severe pneumonia due to nontypable *Haemophilus influenzae*. *J Pediatr Infect Dis and Immunol*, **26**, 207-211 (2014).
- 7) Yano H, Suetake M, Kuga A, Irinoda K, Okamoto R, Kobayashi T, Inoue M. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of nasopharyngeal flora in children attending a day care center. *J Clin Microbiol*, **38**, 625-629 (2000).
- 8) Noel GJ, Hoiseth SK, Edelson PJ. Type b capsule inhibits ingestion of *Haemophilus influenzae* by murine macrophages: studies with isogenic encapsulated and unencapsulated strains. *J Infect Dis*, **166**, 178-182 (1992).
- 9) Hostetter MK. Serotypic variations among virulent pneumococci in deposition and degradation of covalently bound C3b: implications for phagocytosis and antibody production. *J Infect Dis*, **153**, 682-693 (1986).
- 10) Matthay KK, Mentzer WC, Wara DW, Preisler HK, Lameris NB, Ammann AJ. Evaluation of the opsonic requirements for phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* serotypes VII, XIV, and XIX by chemiluminescence assay. *Infect Immun*, **31**, 228-235 (1981).
- 11) Noel GJ, Brittingham A, Granato AA, Mosser DM. Effect of amplification of the Cap b locus on complement-mediated bacteriolysis and opsonization of type b *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, **64**, 4769-4775 (1996).
- 12) Paton JC, Andrew PW, Boulnois GJ, Mitchell TJ. Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu*

- Rev Microbiol*, **47**, 89-115 (1993).
- 13) Griffith F. The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)*, **27**, 113-159 (1928).
 - 14) Kelly T, Dillard JP, Yother J. Effect of genetic switching of capsular type on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, **62**, 1813-1819 (1994).
 - 15) Sutton A, Schneerson R, Kendall-Morris S, Robbins JB. Differential complement resistance mediates virulence of *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun*, **35**, 95-104 (1982).
 - 16) Eskola J, Takala A, Kayhty H, Leinonen M, Kilpi T, Peltola H, Makela PH. Secondary cases of invasive disease caused by spread of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect*, **14**, 233-236 (1987).
 - 17) Takala AK, van Alphen L, Musser JM, Geelen L, Selander RK, Eskola J, Makela PH. Bacteriologic epidemiology of *Hemophilus influenzae* type b strains causing invasive infections in Finland. *J Infect Dis*, **160**, 237-242 (1989).
 - 18) Tozzi AE, Salmaso S, Ciofi degli Atti ML, Panei P, Anemona A, Scuderi G, Wassilak SG. Incidence of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease in Italian children. *Eur J Epidemiol*, **13**, 73-77 (1997).
 - 19) Oikawa J, Ishiwada N, Takahashi Y, Hishiki H, Nagasawa K, Takahashi S, Watanabe M, Chang B, Kohno Y. Changes in nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* among healthy children attending a day-care centre before and after official financial support for the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and *H. influenzae* type b vaccine in Japan. *J Infect Chemother*, **20**, 146-149 (2014).
 - 20) Sakata H, Adachi Y, Morozumi M, Ubukata K. Invasive *Haemophilus influenzae* infections in children in Kamikawa subprefecture, Hokkaido, Japan, 2006-2015: The effectiveness of *H. influenzae* type b vaccine. *J Infect Chemother*, **23**, 459-462 (2017).
 - 21) Whittaker R, Economopoulou A, Dias JG, Bancroft E, Ramliden M, Celentano LP, European Centre for Disease Prevention Control Country Experts for Invasive *Haemophilus influenzae*, Disease. Epidemiology of Invasive *Haemophilus influenzae* Disease, Europe, 2007-2014. *Emerg Infect Dis*, **23**, 396-404 (2017).
 - 22) Tsang RS, Mubareka S, Sill ML, Wylie J, Skinner S, Law DK. Invasive *Haemophilus influenzae* in Manitoba, Canada, in the postvaccination era. *J Clin Microbiol*, **44**, 1530-1535 (2006).
 - 23) Perdue DG, Bulkow LR, Gellin BG, Davidson M, Petersen KM, Singleton RJ, Parkinson AJ. Invasive *Haemophilus influenzae* disease in Alaskan residents aged 10 years and older before and after infant vaccination programs. *JAMA*, **283**, 3089-3094 (2000).
 - 24) Rubach MP, Bender JM, Mottice S, Hanson K, Weng HY, Korgenski K, Daly JA, Pavia

- AT. Increasing incidence of invasive *Haemophilus influenzae* disease in adults, Utah, USA. *Emerg Infect Dis*, **17**, 1645-1650 (2011).
- 25) Blain A, MacNeil J, Wang X, Bennett N, Farley MM, Harrison LH, Lexau C, Miller L, Nichols M, Petit S, Reingold A, Schaffner W, Thomas A, Clark T, Cohn A, Briere E. Invasive *Haemophilus influenzae* Disease in Adults ≥ 65 Years, United States, 2011. *Open Forum Infect Dis*, **1**, ofu044 (2014).
 - 26) Cardines R, Giufre M, Mastrantonio P, Ciofi degli Atti ML, Cerquetti M. Nontypeable *Haemophilus influenzae* meningitis in children: phenotypic and genotypic characterization of isolates. *Pediatr Infect Dis J*, **26**, 577-582 (2007).
 - 27) Daines DA, Bothwell M, Furrer J, Unrath W, Nelson K, Jarisch J, Melrose N, Greiner L, Apicella M, Smith AL. *Haemophilus influenzae luxS* mutants form a biofilm and have increased virulence. *Microb Pathog*, **39**, 87-96 (2005).
 - 28) Ikeda M, Enomoto N, Hashimoto D, Fujisawa T, Inui N, Nakamura Y, Suda T, Nagata T. Nontypeable *Haemophilus influenzae* exploits the interaction between protein-E and vitronectin for the adherence and invasion to bronchial epithelial cells. *BMC Microbiol*, **15**, 263 (2015).
 - 29) Gratten M. *Haemophilus influenzae* biotype VII. *J Clin Microbiol*, **18**, 1015-1016 (1983).
 - 30) Sottnek FO, Albritton WL. *Haemophilus influenzae* biotype VIII. *J Clin Microbiol*, **20**, 815-816 (1984).
 - 31) Enright MC, Spratt B. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol*, **7**, 482-487 (1999).
 - 32) Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3140-3145 (1998).
 - 33) Meats E, Feil EJ, Stringer S, Cody AJ, Goldstein R, Kroll JS, Popovic T, Spratt BG. Characterization of encapsulated and noncapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*, **41**, 1623-1636 (2003).
 - 34) Collins S, Vickers A, Ladhani SN, Flynn S, Platt S, Ramsay ME, Litt DJ, Slack MP. Clinical and Molecular Epidemiology of Childhood Invasive Nontypeable *Haemophilus influenzae* Disease in England and Wales. *Pediatr Infect Dis J*, **35**, e76-84 (2016).
 - 35) 矢野寿一, 角田梨紗枝子, 小澤大樹, 中野竜一. 小児気道感染症におけるインフルエンザ菌のトピックス. 日本臨床微生物学会雑誌, **25**, 13-18 (2015).
 - 36) Uehara S, Sunakawa K, Eguchi H, Ouchi K, Okada K, Kurosaki T, Suzuki H, Tsutsumi H, Haruta T, Mitsuda T, Yamazaki T. Japanese Guidelines for the Management of

- Respiratory Infectious Diseases in Children 2007 with focus on pneumonia. *Pediatr Int*, **53**, 264-276 (2011).
- 37) Sakata H, Toyonaga Y, Sato Y, Hanaki H, Nonoyama M, Oishi T, Sunakawa K. Nationwide survey of the development of drug-resistance in the pediatric field: drug sensitivity of *Haemophilus influenzae* in Japan. *J Infect Chemother*, **15**, 402-409 (2009).
 - 38) Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, Sunakawa K, Inoue M, Konno M. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 1693-1699 (2001).
 - 39) Shiro H, Sato Y, Toyonaga Y, Hanaki H, Sunakawa K. Nationwide survey of the development of drug resistance in the pediatric field in 2000-2001, 2004, 2007, 2010, and 2012: evaluation of the changes in drug sensitivity of *Haemophilus influenzae* and patients' background factors. *J Infect Chemother*, **21**, 247-256 (2015).
 - 40) Williams JD, Cavanagh P. Letter: Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* meningitis. *Lancet*, **1**, 864 (1974).
 - 41) Flournoy DJ. *In vitro* susceptibilities of *Haemophilus influenzae* isolates from a Veterans Administration Medical Center. *Med Microbiol Immunol*, **173**, 303-309 (1985).
 - 42) Sahm DF, Jones ME, Hickey ML, Diakun DR, Mani SV, Thornsberry C. Resistance surveillance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* isolated in Asia and Europe, 1997-1998. *J Antimicrob Chemother*, **45**, 457-466 (2000).
 - 43) Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **289**, 321-331 (1980).
 - 44) 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).
 - 45) Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Nagai K, Jacobs MR, Appelbaum PC, Sunakawa K, Ubukata K. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microb Drug Resist*, **9**, 39-46 (2003).
 - 46) Hasegawa K, Chiba N, Kobayashi R, Morozumi M, Iwata S, Sunakawa K, Ubukata K. Molecular Epidemiology of *Haemophilus influenzae* Strains Isolated from Patients with Meningitis during 1999 to 2003. *J Jpn Assoc Infect Dis*, **78**, 835-845 (2004).
 - 47) Hasegawa K, Kobayashi R, Takada E, Ono A, Chiba N, Morozumi M, Iwata S, Sunakawa K, Ubukata K. Nationwide Surveillance for Bacterial, Meningitis. High prevalence of type b beta-lactamase-non-producing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in meningitis: the situation in Japan where Hib vaccine has not been introduced. *J Antimicrob Chemother*, **57**, 1077-1082 (2006).

- 48) Ubukata K, Chiba N, Morozumi M, Iwata S, Sunakawa K. Longitudinal surveillance of *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with meningitis throughout Japan, 2000-2011. *J Infect Chemother*, **19**, 34-41 (2013).
- 49) Parr TR, Jr., Bryan LE. Mechanism of resistance of an ampicillin-resistant, beta-lactamase-negative clinical isolate of *Haemophilus influenzae* type b to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, **25**, 747-753 (1984).
- 50) Hasegawa K, Chiba N, Kobayashi R, Murayama SY, Iwata S, Sunakawa K, Ubukata K. Rapidly increasing prevalence of beta-lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in patients with meningitis. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 1509-1514 (2004).
- 51) Doern GV, Brueggemann AB, Pierce G, Holley HP, Jr., Rauch A. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of beta-lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: results of a national multicenter surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**, 292-297 (1997).
- 52) Hirakata Y, Ohmori K, Mikuriya M, Saika T, Matsuzaki K, Hasegawa M, Hatta M, Yamamoto N, Kunishima H, Yano H, Kitagawa M, Arai K, Kawakami K, Kobayashi I, Jones RN, Kohno S, Yamaguchi K, Kaku M. Antimicrobial activities of piperacillin-tazobactam against *Haemophilus influenzae* isolates, including beta-lactamase-negative ampicillin-resistant and beta-lactamase-positive amoxicillin-clavulanate-resistant isolates, and mutations in their quinolone resistance-determining regions. *Antimicrob Agents Chemother*, **53**, 4225-4230 (2009).
- 53) Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Buckridge S, Felmingham D. Global distribution of TEM-1 and ROB-1 beta-lactamases in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother*, **56**, 773-776 (2005).
- 54) Kishii K, Chiba N, Morozumi M, Hasegawa K, Ubukata K. Coincidence of *Streptococcus pneumoniae* or *Haemophilus influenzae* isolated simultaneously in epipharynx and middle-ear fluids in pediatric patients with acute otitis media. *Jpn. J. Chemother*, **57**, 76-81 (2009).
- 55) Yokota S, Ohkoshi Y, Sato K, Fujii N. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Haemophilus influenzae* strains among elderly patients but not among children. *J Clin Microbiol*, **46**, 361-365 (2008).
- 56) Kishii K, Chiba N, Morozumi M, Hasegawa K, Ubukata K. Antibiotic susceptibility and resistance gene analysis of *Haemophilus Influenzae* in clinical tebipenem-pivoxil studies in pediatric patients using PCR method. *Jpn. J. Chemother*, **57**, 67-75 (2009).
- 57) Medeiros AA, Levesque R, Jacoby GA. An animal source for the ROB-1 beta-lactamase of *Haemophilus influenzae* type b. *Antimicrob Agents Chemother*, **29**, 212-215 (1986).

- 58) Ubukata K. Drug resistance caused by qualitative changes in respiratory pathogen components. *Jpn. J. Chemother*, **54**, 69-94 (2006).
- 59) Takahata S, Ida T, Senju N, Sanbongi Y, Miyata A, Maebashi K, Hoshiko S. Horizontal gene transfer of *ftsI*, encoding penicillin-binding protein 3, in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**, 1589-1595 (2007).
- 60) Sondergaard A, Witherden EA, Norskov-Lauritsen N, Tristram SG. Interspecies transfer of the penicillin-binding protein 3-encoding gene *ftsI* between *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* can confer reduced susceptibility to beta-lactam antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, **59**, 4339-4342 (2015).
- 61) Poje G, Redfield RJ. Transformation of *Haemophilus influenzae*. *Methods Mol Med*, **71**, 57-70 (2003).
- 62) Nelson MB, Apicella MA, Murphy TF, Vankeulen H, Spotila LD, Rekosh D. Cloning and sequencing of *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P6. *Infect Immun*, **56**, 128-134 (1988).
- 63) Sutcliffe JG. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 3737-3741 (1978).
- 64) Juteau JM, Levesque RC. Sequence analysis and evolutionary perspectives of ROB-1 beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, **34**, 1354-1359 (1990).
- 65) Falla TJ, Crook DW, Brophy LN, Maskell D, Kroll JS, Moxon ER. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol*, **32**, 2382-2386 (1994).
- 66) Kishii K, Morozumi M, Chiba N, Ono A, Ubukata K. Direct detection by real-time PCR of *ftsI* gene mutations affecting MICs of beta-lactam agents for *Haemophilus influenzae* isolates from meningitis. *J Infect Chemother*, **17**, 671-677 (2011).
- 67) Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: M100-S20. (2010).
- 68) Abe K, Hoshino T, Imuta N, Nishi J, Ishiwada N. Bacterial Meningitis Caused by β -lactamase-negative, Ampicillin-resistant Nontypeable *Haemophilus influenzae* in a 1-year-old Girl : A Case Report. *J Jpn Assoc Infect Dis*, **88**, 291-296 (2014).
- 69) Shimizu A, Kaneko M, Ishikawa M, Sanbongi Y, Suzuki T, Takata T. *In vitro* and *in vivo* activity of cefditoren against β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Jpn. J. Chemother*, **51**, 161-166 (2003).
- 70) Bakkali M, Chen TY, Lee HC, Redfield RJ. Evolutionary stability of DNA uptake signal sequences in the Pasteurellaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4513-4518 (2004).
- 71) Goodgal SH, Mitchell MA. Sequence and uptake specificity of cloned sonicated fragments of *Haemophilus influenzae* DNA. *J Bacteriol*, **172**, 5924-5928 (1990).
- 72) Smith HO, Gwinn ML, Salzberg SL. DNA uptake signal sequences in naturally transformable bacteria. *Res Microbiol*, **150**, 603-616 (1999).

- 73) Cyong JC, Kodama K, Yafune A, Takebe M, Takayanagi H. Phase I study of azithromycin - Single dose and multiple dose for 3 days -. *Jpn. J. Chemother*, **43**, 139-163 (1995).
- 74) Shortridge VD, Flamm RK, Ramer N, Beyer J, Tanaka SK. Novel mechanism of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **26**, 73-78 (1996).
- 75) Matsuoka M, Narita M, Okazaki N, Ohya H, Yamazaki T, Ouchi K, Suzuki I, Andoh T, Kenri T, Sasaki Y, Horino A, Shintani M, Arakawa Y, Sasaki T. Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 4624-4630 (2004).
- 76) Pereyre S, Gonzalez P, De Barbeyrac B, Darnige A, Renaudin H, Charron A, Raherison S, Bebear C, Bebear CM. Mutations in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for acquired resistance to macrolides in *M. hominis*. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**, 3142-3150 (2002).
- 77) Morozumi M, Hasegawa K, Kobayashi R, Inoue N, Iwata S, Kuroki H, Kawamura N, Nakayama E, Tajima T, Shimizu K, Ubukata K. Emergence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* with a 23S rRNA gene mutation. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 2302-2306 (2005).
- 78) Leclercq R, Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**, 2727-2734 (2002).
- 79) Clancy J, Petitpas J, Dib-Hajj F, Yuan W, Cronan M, Kamath AV, Bergeron J, Retsema JA. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol*, **22**, 867-879 (1996).
- 80) Descheemaeker P, Chapelle S, Lammens C, Hauchecorne M, Wijdooghe M, Vandamme P, Ieven M, Goossens H. Macrolide resistance and erythromycin resistance determinants among Belgian *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother*, **45**, 167-173 (2000).
- 81) Wondrack L, Massa M, Yang BV, Sutcliffe J. Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**, 992-998 (1996).
- 82) Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, **128**, 1037-1050 (2007).
- 83) Nishino K, Yamaguchi A. Role of xenobiotic transporters in bacterial drug resistance and virulence. *IUBMB Life*, **60**, 569-574 (2008).
- 84) Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 672-693 (2000).

- 85) Nishino K, Yamaguchi A. Physiological functions of drug efflux systems in Gram-negative bacteria: Their roles in bacterial drug resistance and virulence. *Jpn. J. Chemother*, **56**, 443-452 (2008).
- 86) Nishino K, Yamaguchi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **183**, 5803-5812 (2001).
- 87) Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Matsumoto T, Yamaguchi A. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature*, **443**, 173-179 (2006).
- 88) Peric M, Bozdogan B, Jacobs MR, Appelbaum PC. Effects of an efflux mechanism and ribosomal mutations on macrolide susceptibility of *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 1017-1022 (2003).
- 89) Roberts MC, Soge OO, No DB. Characterization of macrolide resistance genes in *Haemophilus influenzae* isolated from children with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother*, **66**, 100-104 (2011).
- 90) Atkinson CT, Kunde DA, Tristram SG. Acquired macrolide resistance genes in *Haemophilus influenzae*? *J Antimicrob Chemother*, **70**, 2234-2236 (2015).
- 91) Atkinson CT, Kunde DA, Tristram SG. Acquired macrolide resistance genes in *Haemophilus influenzae*?-authors' response. *J Antimicrob Chemother*, **70**, 3409-3410 (2015).
- 92) Roberts MC, No DB, Soge OO. Comment on: Acquired macrolide resistance genes in *Haemophilus influenzae*? *J Antimicrob Chemother*, **70**, 3408-3409 (2015).
- 93) Sanchez L, Pan W, Vinas M, Nikaido H. The *acrAB* homolog of *Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. *J Bacteriol*, **179**, 6855-6857 (1997).
- 94) Trepod CM, Mott JE. Identification of the *Haemophilus influenzae tolC* gene by susceptibility profiles of insertionally inactivated efflux pump mutants. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 1416-1418 (2004).
- 95) Kaczmarek FS, Gootz TD, Dib-Hajj F, Shang W, Hallowell S, Cronan M. Genetic and molecular characterization of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 1630-1639 (2004).
- 96) Nye KJ, Fallon D, Gee B, Messer S, Warren RE, Andrews N. A comparison of blood agar supplemented with NAD with plain blood agar and chocolate blood agar in the isolation of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from sputum. Bacterial Methods Evaluation Group. *J Med Microbiol*, **48**, 1111-1114 (1999).
- 97) Noguchi N, Tano J, Nasu Y, Koyama M, Narui K, Kamishima H, Saito T, Tsuyuki K, Sasatsu M. Antimicrobial susceptibilities and distribution of resistance genes for beta-lactams and macrolides in *Streptococcus pneumoniae* isolated between 2002 and 2004

- in Tokyo. *Int J Antimicrob Agents*, **29**, 26-33 (2007).
- 98) Clark C, Bozdogan B, Peric M, Dewasse B, Jacobs MR, Appelbaum PC. *In vitro* selection of resistance in *Haemophilus influenzae* by amoxicillin-clavulanate, cefpodoxime, cefprozil, azithromycin, and clarithromycin. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**, 2956-2962 (2002).
 - 99) Kriegeskorte A, Grubmuller S, Huber C, Kahl BC, von Eiff C, Proctor RA, Peters G, Eisenreich W, Becker K. *Staphylococcus aureus* small colony variants show common metabolic features in central metabolism irrespective of the underlying auxotrophism. *Front Cell Infect Microbiol*, **4**, 141 (2014).
 - 100) Ma D, Alberti M, Lynch C, Nikaido H, Hearst JE. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol Microbiol*, **19**, 101-112 (1996).
 - 101) Nikaido E, Yamaguchi A, Nishino K. AcrAB multidrug efflux pump regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals. *J Biol Chem*, **283**, 24245-24253 (2008).
 - 102) 感染症治療ガイド・ガイドライン作成委員会. JAID/JSC 感染症治療ガイドライン -呼吸器感染症-. *Jpn. J. Chemother*, **62**, 1-109 (2014).
 - 103) Alagic-Smailbegovic J, Saracevic E, Sutalo K. Azythromycin versus amoxicillin-clavulanate in the treatment of acute sinusitis in children. *Bosn J Basic Med Sci*, **6**, 76-78 (2006).
 - 104) Diaz MH, Benitez AJ, Winchell JM. Investigations of *Mycoplasma pneumoniae* infections in the United States: trends in molecular typing and macrolide resistance from 2006 to 2013. *J Clin Microbiol*, **53**, 124-130 (2015).
 - 105) Ozawa D, Yano H, Hidaka H, Kakuta R, Komatsu M, Endo S, Kanamori H, Kaku M, Katori Y. Twelve-year survey (2001-2012) of the antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolates from otorhinolaryngology clinics in Miyagi Prefecture, Japan. *J Infect Chemother*, **20**, 702-708 (2014).
 - 106) Tikhonova EB, Zgurskaya HI. AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* Form a Stable Intermembrane Multidrug Efflux Complex. *J Biol Chem*, **279**, 32116-32124 (2004).
 - 107) Symmons MF, Bokma E, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V. The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 7173-7178 (2009).
 - 108) Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Yamaguchi A. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*, **419**, 587-593 (2002).
 - 109) Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S, Nishino K, Yamaguchi A. Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. *Nature*, **480**, 565-569 (2011).

- 110) Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S, Hayashi K, Nagata C, Hoshino K, Onodera Y, Nishino K, Yamaguchi A. Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters. *Nature*, **500**, 102-106 (2013).
- 111) Dobson L, Remenyi I, Tusnady GE. CCTOP: a Consensus Constrained TOPology prediction web server. *Nucleic Acids Res*, **43**, W408-412 (2015).
- 112) Fujihira E, Tamura N, Yamaguchi A. Membrane topology of a multidrug efflux transporter, AcrB, in *Escherichia coli*. *J Biochem*, **131**, 145-151 (2002).
- 113) Nishino K, Latifi T, Groisman EA. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*, **59**, 126-141 (2006).
- 114) Georgiou M, Munoz R, Roman F, Canton R, Gomez-Lus R, Campos J, De La Campa AG. Ciprofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae* strains possess mutations in analogous positions of GyrA and ParC. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**, 1741-1744 (1996).
- 115) Kuo SC, Chen PC, Shiau YR, Wang HY, Lai JFs, Huang W, Lauderdale TL. Levofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae*, Taiwan, 2004-2010. *Emerg Infect Dis*, **20**, 1386-1390 (2014).
- 116) Li X, Mariano N, Rahal JJ, Urban CM, Drlica K. Quinolone-resistant *Haemophilus influenzae* in a long-term-care facility: nucleotide sequence characterization of alterations in the genes encoding DNA gyrase and DNA topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 3570-3572 (2004).
- 117) Perez-Vazquez M, Roman F, Garcia-Cobos S, Campos J. Fluoroquinolone resistance in *Haemophilus influenzae* is associated with hypermutability. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**, 1566-1569 (2007).
- 118) Puig C, Tirado-Velez JM, Calatayud L, Tubau F, Garmendia J, Ardanuy C, Marti S, de la Campa AG, Linares J. Molecular characterization of fluoroquinolone resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, **59**, 461-466 (2015).
- 119) Kashida Y, Kato M. Toxic effects of quinolone antibacterial agents on the musculoskeletal system in juvenile rats. *Toxicol Pathol*, **25**, 635-643 (1997).
- 120) Hori S, Irimajiri S, Koido N, Sunakawa K. Safety profile of pediatric tosufloxacin. *Jpn. J. Chemother*, **58**, 78-88 (2010).
- 121) Iwata S, Suzuki K, Takayama S, Sunekawa K. Evaluation of safety and efficacy of tosufloxacin granules for children in bacterial pneumonia and otitis media. *Jpn. J. Chemother*, **62**, 204-216 (2014).
- 122) Fukuda Y, Sugiura Y, Hisada H, Oogake N, Ito Y, Takahata M, Mitsuyama J. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of tosufloxacin tosylate hydrate against major causative

- bacteria of pneumonia and otitis media in pediatric patients. *Jpn. J. Chemother*, **58**, 1-11 (2010).
- 123) Furubo S, Fukuda H, Kozaki T, Akune A, Sanzen T. Toxicity studies of tosufloxacin tosylate hydrate in juvenile animals and class effects studies. *Jpn. J. Chemother*, **58**, 12-23 (2010).
 - 124) 交久瀬善隆. 小児へのニューキノロン薬の使用 2) 企業の立場から. 化学療法の領域, **25**, 1336-1341 (2009).
 - 125) Shen LL, Mitscher LA, Sharma PN, O'Donnell TJ, Chu DW, Cooper CS, Rosen T, Pernet AG. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug--DNA binding model. *Biochemistry*, **28**, 3886-3894 (1989).
 - 126) Hooper DC. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat*, **2**, 38-55 (1999).
 - 127) Shoji H, Shirakura T, Fukuchi K, Takuma T, Hanaki H, Tanaka K, Niki Y. A molecular analysis of quinolone-resistant *Haemophilus influenzae*: validation of the mutations in Quinolone Resistance-Determining Regions. *J Infect Chemother*, **20**, 250-255 (2014).
 - 128) Davies TA, Kelly LM, Hoellman DB, Ednie LM, Clark CL, Bajaksouzian S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Activities and postantibiotic effects of gemifloxacin compared to those of 11 other agents against *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**, 633-639 (2000).
 - 129) Mitsubuchi H, Matsuda I, Nobukuni Y, Heidenreich R, Indo Y, Endo F, Mallee J, Segal S. Gene analysis of Mennonite maple syrup urine disease kindred using primer-specified restriction map modification. *J Inherit Metab Dis*, **15**, 181-187 (1992).
 - 130) Kishii K, Chiba N, Morozumi M, Hamano-Hasegawa K, Kurokawa I, Masaki J, Ubukata K. Diverse mutations in the *ftsI* gene in ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with acute otitis media. *J Infect Chemother*, **16**, 87-93 (2010).
 - 131) Biedenbach DJ, Jones RN. Five-year analysis of *Haemophilus influenzae* isolates with reduced susceptibility to fluoroquinolones: prevalence results from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **46**, 55-61 (2003).
 - 132) Yoshizumi S, Takahashi Y, Watanabe Y, Okezaki E, Ishii Y, Tateda K. *In vitro* antibacterial activities of new fluoroquinolones against clinical isolates of *Haemophilus influenzae* with ciprofloxacin-resistance-associated alterations in GyrA and ParC. *Chemotherapy*, **50**, 265-275 (2004).
 - 133) Perez-Vazquez M, Roman F, Aracil B, Canton R, Campos J. Laboratory detection of *Haemophilus influenzae* with decreased susceptibility to nalidixic acid, ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin due to GyrA and ParC mutations. *J Clin Microbiol*, **42**, 1185-1191 (2004).

- 134) Fukuda H, Hori S, Hiramatsu K. Antibacterial activity of gatifloxacin (AM-1155, CG5501, BMS-206584), a newly developed fluoroquinolone, against sequentially acquired quinolone-resistant mutants and the *norA* transformant of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **42**, 1917-1922 (1998).
- 135) Bansal S, Tandon V. Contribution of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV genes to ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents*, **37**, 253-255 (2011).
- 136) Heisig P. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**, 879-885 (1996).
- 137) 公益社団法人日本医師会, 公益社団法人日本薬剤師会, 日本大学薬学部薬学研究科, 株式会社 EM システムズ. 薬局サーベイランス日報. (<http://prescription.orca.med.or.jp/syndromic/kanjyasuikei/index.html>), accessed December 19, 2017.
- 138) Takahashi A, Matsumoto K, Utsunomiya Y, Tao M, Akiyama M, Morito T, Watanabe K. Laboratory and clinical evaluation of T-3262 -A usefulness in pneumococcal respiratory tract infections-. *Chemotherapy*, **36**, 675-693 (1988).
- 139) Nasu M, Yamazaki Y, Yamazaki H, Kuroda Y, Goto Y, Shigeno H, Goto J, Tashiro T. T-3262 in respiratory tract infections. *Chemotherapy*, **36**, 699-709 (1988).
- 140) Erwin AL, Smith AL. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior. *Trends Microbiol*, **15**, 355-362 (2007).
- 141) Okabe T, Yamazaki Y, Shiotani M, Suzuki T, Shiohara M, Kasuga E, Notake S, Yanagisawa H. An amino acid substitution in PBP-3 in *Haemophilus influenzae* associate with the invasion to bronchial epithelial cells. *Microbiol Res*, **165**, 11-20 (2010).
- 142) Bogdanovich T, Bozdogan B, Appelbaum PC. Effect of efflux on telithromycin and macrolide susceptibility in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**, 893-898 (2006).
- 143) Noguchi N, Nakaminami H, Nakase K, Sasatsu M. Characterization of enterococcus strains contained in probiotic products. *Biol Pharm Bull*, **34**, 1469-1473 (2011).
- 144) Gutell RR, Larsen N, Woese CR. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol Rev*, **58**, 10-26 (1994).
- 145) de Vries LE, Christensen H, Skov RL, Aarestrup FM, Agerso Y. Diversity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* and identification of Tn916- and Tn5801-like (Tn6014) transposons in *Staphylococcus aureus* from humans and animals. *J Antimicrob Chemother*, **64**, 490-500 (2009).
- 146) Kayser FH, Wust J, Corrodi P. Transduction and elimination of resistance determinants

- in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **2**, 217-223 (1972).
- 147) Chang A, Adlowitz DG, Yellamatty E, Pichichero M. *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P6 molecular characterization may not differentiate all strains of *H. Influenzae* from *H. haemolyticus*. *J Clin Microbiol*, **48**, 3756-3757 (2010).
 - 148) Chen H, Ma Y, Yang J, O'Brien CJ, Lee SL, Mazurkiewicz JE, Haataja S, Yan JH, Gao GF, Zhang JR. Genetic requirement for pneumococcal ear infection. *PLoS One*, **3**, e2950 (2008).
 - 149) Ubukata K, Iwata S, Sunakawa K. In vitro activities of new ketolide, telithromycin, and eight other macrolide antibiotics against *Streptococcus pneumoniae* having *mefA* and *ermB* genes that mediate macrolide resistance. *J Infect Chemother*, **9**, 221-226 (2003).
 - 150) Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. (2013).
 - 151) Wright LD, Grossman AD. Autonomous Replication of the Conjugative Transposon Tn916. *J Bacteriol*, **198**, 3355-3366 (2016).
 - 152) Klugman KP, Lonks JR. Hidden epidemic of macrolide-resistant pneumococci. *Emerg Infect Dis*, **11**, 802-807 (2005).
 - 153) Dowson CG, Hutchison A, Woodford N, Johnson AP, George RC, Spratt BG. Penicillin-resistant viridans streptococci have obtained altered penicillin-binding protein genes from penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5858-5862 (1990).
 - 154) Mell JC, Hall IM, Redfield RJ. Defining the DNA uptake specificity of naturally competent *Haemophilus influenzae* cells. *Nucleic Acids Res*, **40**, 8536-8549 (2012).
 - 155) Spratt BG, Bowler LD, Zhang QY, Zhou J, Smith JM. Role of interspecies transfer of chromosomal genes in the evolution of penicillin resistance in pathogenic and commensal Neisseria species. *J Mol Evol*, **34**, 115-125 (1992).
 - 156) Dowson CG, Hutchison A, Brannigan JA, George RC, Hansman D, Linares J, Tomasz A, Smith JM, Spratt BG. Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 8842-8846 (1989).
 - 157) Moscoso M, Claverys JP. Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA. *Mol Microbiol*, **54**, 783-794 (2004).
 - 158) Soge OO, Roberts MC. *tet(M)*-carrying *Haemophilus influenzae* as a potential reservoir for mobile antibiotic resistance genes. *J Antimicrob Chemother*, **66**, 1642-1643 (2011).
 - 159) 内閣官房: 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 2016-2020. 東京. (2016).

- 160) Muraki Y, Yagi T, Tsuji Y, Nishimura N, Tanabe M, Niwa T, Watanabe T, Fujimoto S, Takayama K, Murakami N, Okuda M. Japanese antimicrobial consumption surveillance: First report on oral and parenteral antimicrobial consumption in Japan (2009-2013). *J Glob Antimicrob Resist*, 7, 19-23 (2016).

【 研究成果の掲載誌 】

本論文は以下の報告を中心としてまとめた。

1. Wajima T, Seyama S, Nakamura Y, Kashima C, Nakaminami H, Ushio M, Fujii T, Noguchi N. Prevalence of macrolide-non-susceptible isolates among β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in a tertiary care hospital in Japan. *J Glob Antimicrob Resist*. 6: 22-26. 2016.
2. Seyama S, Wajima T, Nakaminami H, Noguchi N. Clarithromycin resistance mechanisms of epidemic β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 60: 3207-3210. 2016.
3. Seyama S, Wajima T, Nakaminami H, Noguchi N. Amino acid substitution in the major multidrug efflux transporter protein AcrB contributes to low susceptibility to azithromycin in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 61: e01337-17. 2017.
4. Seyama S, Wajima T, Yanagisawa Y, Nakaminami H, Ushio M, Fujii T, Noguchi N. Rise in *Haemophilus influenzae* with reduced quinolone susceptibility and development of a simple screening method. *Pediatr Infect Dis J*. 36: 263-266. 2017.
5. Seyama S, Wajima T, Suzuki M, Ushio M, Fujii T, Noguchi N. Emergence and molecular characterization of *Haemophilus influenzae* harbouring *mef(A)*. *J Antimicrob Chemother*. 72: 948-949. 2017.
6. Seyama S, Wajima T, Suzuki M, Ushio M, Fujii T, Noguchi N. Emergence and molecular characterization of *Haemophilus influenzae* harbouring *mef(A)*—authors' response. *J Antimicrob Chemother*. 72: 1846. 2017