

キノロン低感受性 *Haemophilus influenzae* に関する研究

2022年度

東京薬科大学大学院 薬学研究科

田中 愛海

【 目 次 】

緒言	1
第1章：キノロン低感受性 <i>Haemophilus influenzae</i> の簡易検出法の開発	
背景	7
材料・方法	9
1. 使用菌株	9
2. 培養条件	9
3. ディスク拡散法	9
4. PCR法による低感受性株の検出	11
5. 統計解析	11
結果	12
1. 各種キノロン系薬に対する阻止円径とキノロン感受性の関連	12
2. QRDRのアミノ酸置換と阻止円径の関連	13
3. オールドキノロン系薬を用いたディスク拡散法の精度	14
考察	15
第2章：遺伝子水平伝播を介したキノロン低感受性株の出現機構の解析	
第1節：キノロン低感受性 <i>Haemophilus influenzae</i> の水平伝播機構の解析	
背景	16
材料・方法	17
1. <i>gyrA</i> の系統解析	17
2. 水平伝播実験	17
3. キノロン標的遺伝子の解析	22
4. 抗菌薬感受性試験	22
5. 統計解析	23
結果	24
1. <i>gyrA</i> の系統解析	24
2. キノロン低感受性株の培養上清を用いた水平伝播実験	25
3. Uptake signal sequence の影響	28
4. <i>parC</i> の水平伝播と USS の検討	29
5. 臨床分離株に対する水平伝播	33
第2節：複数遺伝子の同時水平伝播の検討	
背景	34
材料・方法	35
1. 水平伝播実験	35

2. キノロン標的遺伝子の解析	35
3. 抗菌薬感受性試験	35
4. ゲノム解析	35
5. 統計解析	36
結果	37
1. ゲノム DNA を用いた同時水平伝播の検証	37
2. ゲノム解析	38
考察	40
総括	42
謝辞	43
引用文献	45
研究成果の掲載誌	53

【 略 語 一 覧 】

AMP	ampicillin
AMR	antimicrobial resistance
AZM	azithromycin
BHI	brain heart infusion
BLNAR	β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant <i>Haemophilus influenzae</i>
BLPAR	β -lactamase-producing ampicillin-resistant <i>Haemophilus influenzae</i>
CAMHB	cation-adjusted Mueller-Hinton broth
CC	clonal complex
CFU	colony-forming units
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> type b
LHB	lysed horse blood
LOD	limit of detection
LVX	levofloxacin
MHB	Mueller-Hinton broth
MIC	minimum inhibitory concentration
NA	nalidixic acid
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
NOR	norfloxacin
NTHi	nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i>
OD	optical density
PBP	penicillin-binding protein
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
PPA	pipemidic acid
QRDR	quinolone resistance-determining region
sBHI	supplemented brain heart infusion
ST	sequence type
TBP	tebipenem
TFX	tosufloxacin
USLS	uptake signal-like sequence
USS	uptake signal sequence

【 緒 言 】

Haemophilus influenzae (インフルエンザ菌) は, *Pasteurella* 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^{1,2)}。本菌名は, 1892年にドイツの細菌学者 Pfeiffer および Kitasato が, 流行性感冒 (インフルエンザ) 患者の喀痰から原因微生物として本菌を分離したことに由来する³⁾。その後, 1930年代にインフルエンザの原因が influenza virus であり, 本菌によるものではないことが明らかにされたが, その菌名は依然として維持されている。本菌の大きさは 0.3~0.5 μm \times 0.5~1.0 μm と, 他のグラム陰性桿菌よりも小さいことから短桿菌と呼ばれる。本菌は栄養要求性が高く, 培養に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) の両者を必要とする¹⁾。そのため, ウマもしくはウサギの血液を添加し, 加熱処理したチョコレート寒天培地が培養に使用される。*H. influenzae* はヒトの鼻咽頭に常在し, 特に乳幼児の多くが保菌している^{4,5)}。本菌は病原性細菌としての側面も併せ持ち, 侵襲性感染症から非侵襲性感染症まで多様な感染症を誘発する⁵⁾。本菌による侵襲性感染症には敗血症や髄膜炎などがあり, 一般的に重症例が多い。一方, 非侵襲性感染症には, 肺炎, 急性中耳炎, 急性副鼻腔炎などがある。比較的軽症例が多いが, 侵襲性感染症の原発巣となることもある。*H. influenzae* 感染症は, 気道分泌物を介した飛沫・接触感染によってヒト-ヒト間で伝染する。特に, 免疫系が未発達な小児では, 家庭内や集団保育などの接触密度の高い環境下で, 容易に伝染すると言われている^{6,7)}。

H. influenzae は, 表層構造の違いから莢膜型株と無莢膜型株 (nontypeable *H. influenzae*, NTHi) に大別される^{1,8)}。莢膜型株は, 菌体外膜の外側に多糖体で形成された莢膜を有している。莢膜は, 免疫細胞による貪食や補体による溶菌などの免疫応答への回避作用を有するとされており, 病原性の発現に重要な因子である⁹⁻¹⁵⁾。莢膜は, その糖鎖構造ならびに抗原性の違いから a~f の 6 種類に分けられる⁸⁾。このうち, b 型の莢膜型株 *H. influenzae* type b (Hib) は高病原性であり, 従来, 小児の侵襲性感染症の原因のほとんどを占めていた^{16,17)}。莢膜に対する抗体は中和抗体として機能することから, Hib を対象としたワクチン (Hib ワクチン) が開発され, 本邦でも 2008 年 12 月より, Hib 莢膜多糖体タンパク結合ワクチンが任意接種化された¹⁸⁾。2013 年 4 月からは定期接種の対象となり, 生後 2 ヶ月~5 歳の小児を対象に計 4 回のワクチン接種が行われている。このワクチンの導入により, Hib による感染症は激減した¹⁹⁻²¹⁾。しかしながら, 他の莢膜型株および NTHi による感染症は減少しておらず, Hib による感染者数が減少したことで, それ以外の株, 特に NTHi 感染者の割合が相対的に上昇している²²⁻²⁵⁾。

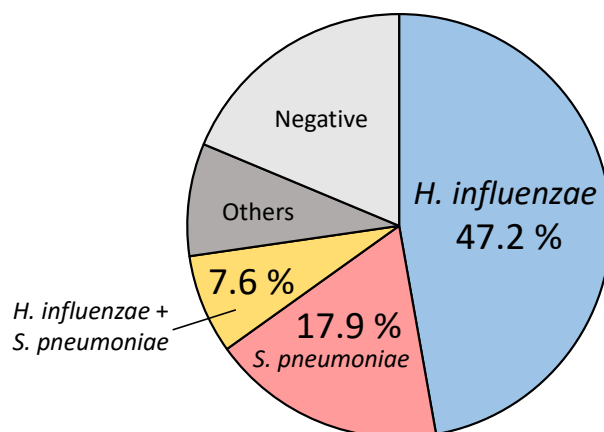


Figure 1. Causative pathogen of acute otitis media between 2016-2017.
(Ubukata et al. J Infect Chemother. 25 (2019) 720-726 より引用改変²⁶⁾)

非侵襲性感染症については、従前より大部分が NTHi によって引き起こされる²⁷⁾。同様の疾患の原因となる *Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌) では、小児に対する肺炎球菌結合型ワクチンの導入により分離頻度が減少傾向にある。その結果、非侵襲性感染症においても NTHi による感染症が相対的に増加している (Figure 1)²⁶⁾。NTHi の病原因子として、細胞付着因子およびバイオフィーム形成などが考えられているものの、その疾患を引き起こす機序あるいは必須の因子は依然として明らかになっていない^{28, 29)}。

NTHi 感染症の治療には、第一選択薬として、 β -ラクタム系薬が使用される^{30, 31)}。 β -ラクタム系薬は、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) のペプチド架橋反応を阻害することで抗菌作用を示す。NTHi の β -ラクタム系薬への耐性化には、2つの機序がある。1つ目は β -ラクタム系薬を分解する酵素である β -lactamase の産生によるものであり³²⁻³⁴⁾、2つ目は標的部位である PBP3 にアミノ酸変異が生じ、薬剤親和性が低下することによるものである^{33, 35, 36)}。前者は β -lactamase-producing ampicillin-resistant *H. influenzae* (BLPAR)、後者は β -lactamase-non-producing ampicillin-resistant *H. influenzae* (BLNAR) と呼ばれている。既報によれば、日本で分離される *H. influenzae* の半数以上は ampicillin (AMP) 耐性菌で³⁷⁻³⁹⁾、特に BLNAR の割合が欧米諸国のそれよりも高い傾向にある^{40, 41)}。BLPAR はペニシリン系薬を分解するため、ペニシリン系薬には高い耐性を示すが、セファロスポリン系薬に対しては感受性が維持されている。一方、BLNAR は高度耐性化しにくいものの、ペニシリン系薬だけでなくセファロスポリン系、カルバペネム系薬に対しても感受性が低下する^{36, 42)}。抗菌薬の使用量と耐性菌の出現は密接に関連しており、日本で BLNAR が多い要因として、欧米諸国と比較して第3世代セファロスポリン系薬の使用量が多いことが挙げられている^{35, 43, 44)}。BLNAR による感染症あるいは宿主の β -ラクタム系薬に対するアレルギー等の素因から β -ラクタム系薬が

使用できない場合には、代替薬としてマクロライド系薬およびキノロン系薬が使用される³⁰⁾。キノロン系薬には、オールドキノロンとニューキノロン系薬がある。日本ではオールドキノロン系薬は臨床で使用されていないため、本論文ではニューキノロン系薬をキノロン系薬と呼称している。マクロライド系薬は、一般的にグラム陰性桿菌に対して抗菌活性が低い⁴⁵⁾。加えて、マクロライド系薬に対しては、2009年のアジスロマイシンの小児細粒導入以降、染色体性排出ポンプの亢進による耐性株が増加している⁴⁶⁾。一方、キノロン系薬はグラム陰性桿菌に対して非常に高い抗菌活性を示し、小児に使用可能なレスピラトリーキノロンである tosfloxacin 小児細粒が2010年に上市されたことも重なり、耐性菌による呼吸器感染症治療薬として汎用されるようになった (Figure 2)。

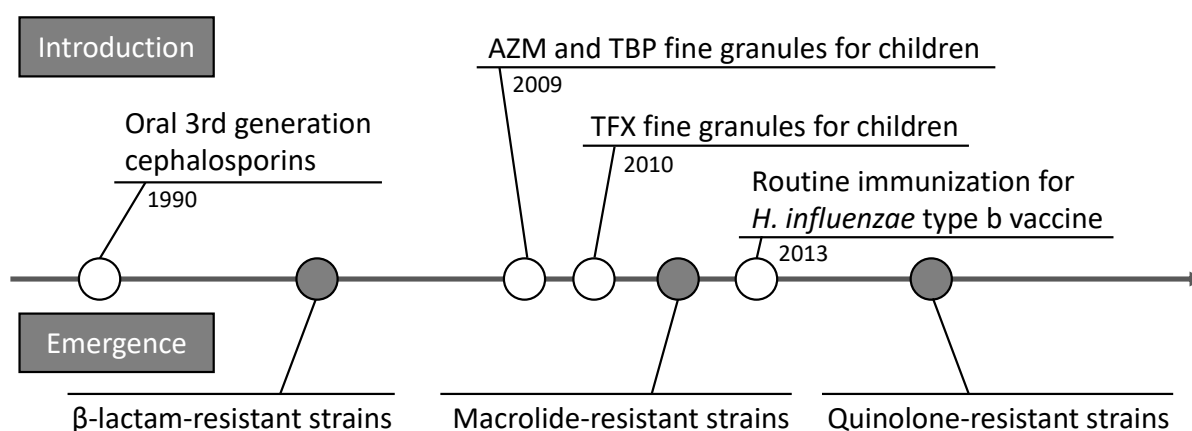


Figure 2. Timeline of introduction of agents and vaccine in pediatric field and emergence of antimicrobial-resistant strains.

AZM, azithromycin; TBP, tebipenem; TFX, tosfloxacin.

キノロン系薬は、細菌の DNA 複製に必須の酵素である DNA gyrase や topoisomerase IV に作用し、DNA 複製を阻害する。抗菌スペクトルが広く、かつ組織移行性も良好であることから、成人の市中呼吸器感染症には、原因微生物を同定せずに経験的に用いられることが多い^{30, 47)}。キノロン系薬は、若い成犬 (13 ヶ月齢) および幼若ラットを用いた動物実験において関節異常が認められたことにより、小児に対しては tosfloxacin と norfloxacin 以外は投与禁忌となっている⁴⁸⁾。先述したように、2010年に tosfloxacin 小児細粒が導入されたが、2013年ごろから小児由来臨床分離株において、キノロン耐性決定領域 (quinolone resistance-determining region, QRDR) に変異を有する感受性が低下した株 (キノロン低感受性株) が出現・増加している (Figure 3)^{34, 38, 49-51)}。Tosfloxacin の使用量増加は、2012年のマクロライド耐性 *Mycoplasma pneumoniae* の流行も影響しており⁵²⁾、*S. pneumoniae* においてもキノロン耐性株の出現が報告されている⁵³⁻⁵⁵⁾。加えて、2018~2019年には、神奈川県と東京都の複数の地域で sequence type (ST) 422 のキノロン低感受性株のアウトブレイク

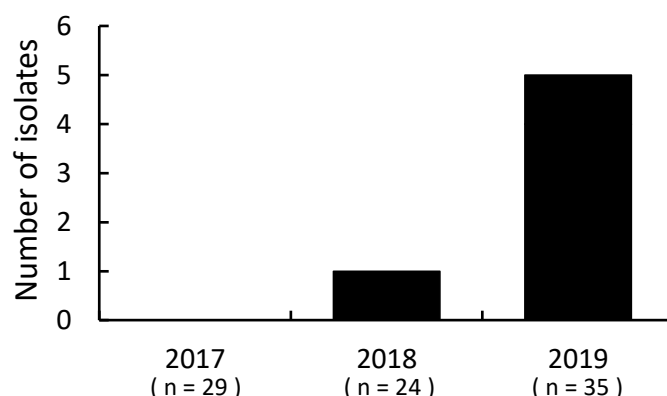


Figure 3. Number of quinolone low-susceptible *H. influenzae* isolates from a hospital between 2017 and 2019.

(Tanaka et al. J Infect Chemother. 27 (2021) 962-966 より引用⁵⁷⁾)

クが報告された^{56, 57)}。このアウトブレイククローンは他の地域からも分離されており、キノロン低感受性株が急速に拡散していることを表している⁴⁹⁾。

キノロン系薬に対する耐性化は、DNA gyrase をコードする *gyrA* と *gyrB* および topoisomerase IV をコードする *parC* と *parE* の QRDRs での点変異で、キノロン系薬の結合部位にアミノ酸置換を生じ、薬剤との結合親和性が低下することに起因する⁵⁸⁻⁶¹⁾。*H. influenzae* をはじめとするグラム陰性菌の場合、まず *gyrA* に変異が生じ、キノロン系薬による最小発育阻止濃度 (MIC) が上昇する。次いで *parC* にも点変異が生じることで耐性度が段階的に上昇する (Figure 4)⁶²⁾。Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の基準では、成人の呼吸器感染症に使用される levofloxacin (LVX) で、薬剤感受性ブレイクポイントが定められており、MIC 値が 2 µg/mL 以下の場合に、感受性と判定される⁶³⁾。先述したように *H. influenzae* は、キノロン感受性が非常に高い (LVX MIC = 0.008~0.016 µg/mL) ことから、*gyrA* のみに変異を有する株の LVX の MIC は 0.125 µg/mL に、*gyrA* と *parC* の両方に変異を有した場合でも MIC は 0.5~1 µg/mL に留まっていることが多く、感受性株とは異なる MIC の分布を示すにもかかわらず「感受性」と判定されている。

Tosufloxacin 小児細粒の用法・用量は、1回 6 mg/kg (tosufloxacin として 4.1 mg/kg) を 1日 2回経口投与となっている。この投与方法での薬物動態は最高血中濃度 (Cmax) が 0.96 ± 0.30 µg/mL となることがインタビューフォームに示されている⁶⁴⁾。そのため、QRDR に変異を持つキノロン低感受性株に対し、この用量では殺菌性が不十分であるとの懸念が示されている。実際、キノロン低感受性 *H. influenzae* に対する tosufloxacin の効果を検討した研究において、小児用量の Cmax の tosufloxacin に長時間暴露しても低感受性株は残存することが報告されている (Figure 5)^{38, 65)}。

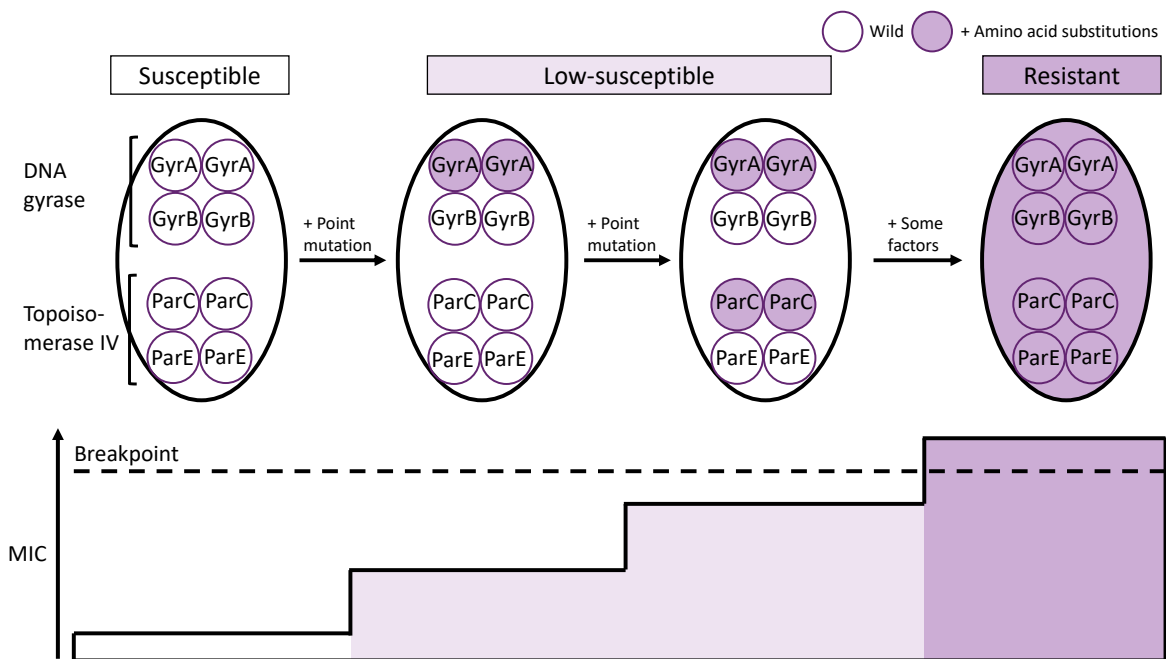


Figure 4. Schematic model of quinolone resistance development in *Haemophilus influenzae*.

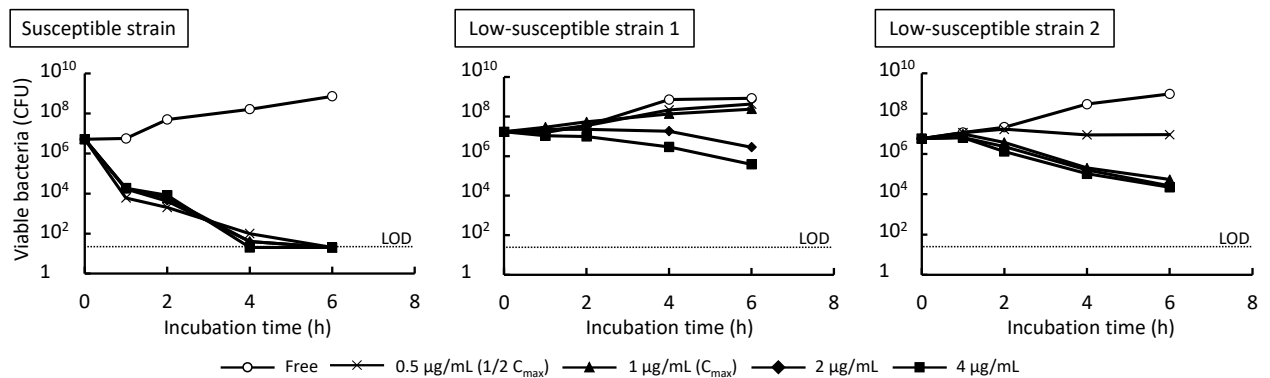


Figure 5. Time-kill curve in the presence of various concentrations of tosofloxacin.

Quinolone susceptible or low-susceptible strains were inoculated into sBHI with or without tosofloxacin. Bacterial CFUs were monitored at each time point. sBHI, supplemented brain heart infusion; LOD, the limit of detection (20 CFU/mL). (Mizoi et al. J Med Microbiol. 70 (2021) 001376 より引用⁶⁵⁾)

さらに、臨床での後方視的研究で、キノロン低感受性株が原因と推定される小児呼吸器感染症患者に *tosufloxacin* が処方されたものの、薬物治療が奏功せず、治療薬が変更となった症例も報告されている⁶⁶⁾。すなわち、現状ではキノロン低感受性株は「感受性」と判定されるため、キノロン系薬が治療の選択肢となりうるが、キノロン低感受性株の増加によって、治療に難渋する例が増加することが危惧される。そのため、臨床現場でキノロン低感受性株を適切に検出し、キノロン系薬の適正使用を行う必要がある。加えて、*H. influenzae* のキノロン低感受性株は、その出現機構および急速な拡散機構など不明な点が数多くある。この様な菌の出現および伝播を防ぐ新たな薬剤を開発するために、キノロン低感受性株の出現要因の解明が必要となる。

本研究では、キノロン系抗菌薬の適正使用を促進し、キノロン耐性 *H. influenzae* の出現・流行を抑止することを目的として、第 1 章では、キノロン低感受性 *H. influenzae* を臨床現場で簡便に検出する方法について検討した。第 2 章では、*H. influenzae* のキノロン低感受性株の出現・拡散機構を解明した。

第 1 章

キノロン低感受性 *Haemophilus influenzae* の簡易検出法の開発

【 背 景 】

適切な感染症治療では、まず原因微生物の薬物への感受性を把握することが求められる。キノロン低感受性 *H. influenzae* は、キノロン系薬による治療に抵抗性を示すにも関わらず^{38, 65, 66}、現行で使用されている基準を用いた感受性試験では「感受性」と判定されるため、実質的に検出することができない。現状、キノロン低感受性株を検出するには、手動による詳細な感受性測定および遺伝子解析が必要となる。

一般的に、臨床現場で薬剤感受性試験に使用される微量液体希釈法は、数段階に希釈した薬剤に試験菌を接種・培養後、MIC を測定する方法である。多くの病院では、MIC の自動測定器が使用されており、CLSI の基準に沿って、感受性の度合いを耐性・中等度耐性・感受性として判定するため、必要最小限の濃度しか測定されない。そのため、この方法で低感受性株を検出するには、基準の改定あるいは手動による多くの濃度の測定が必要となる。手動で試験を行う場合は、バリデーシヨンのための細かな規定に従う必要があることから、検査技師の手間と経験が要求される。近年、PCR 法を用いた遺伝子検査による低感受性株の検出法が開発された⁶⁷。この PCR 法は、目的の耐性遺伝子や標的遺伝子内の変異の有無を遺伝子増幅により検出することから、短時間で判定することができ、かつ感度・特異度も高い⁶⁸。しかしながら、試薬などコスト面での負担が大きいことや、遺伝子に基づく検出法のため、プライマー配列中のアミノ酸置換を伴わない変異などでも低感受性株として検出してしまう恐れがある。そのため、簡便かつ感度、特異度が高い検出法の開発が望まれている。

キノロン系薬の開発は、1960 年代にオールドキノロン系の *nalidixic acid* (NA) が、マラリアの特効薬である *chloroquine* の合成中間体として得られたことに端を発する^{69, 70}。NA は DNA gyrase に作用し、*Pseudomonas aeruginosa* を除くグラム陰性菌に抗菌活性を示したものの、代謝による分解を受けやすいことなどから、一部の尿路感染症への適応のみにとどまった。その後、7 位に *piperazinyl* 基が導入されたことにより代謝安定性や組織移行性が改良され、抗菌作用を高めた *pipemidic acid* (PPA) が開発された⁷¹。さらに、*quinoline* 環の 6 位にフッ素原子を導入することで、DNA gyrase に加え *topoisomerase IV* にも阻害作用を示すようになった。その結果、グラム陽性菌にも抗菌スペクトルが拡大し、体内動態も改良された *norfloxacin* (NOR) が登場し、臨床で広く使用されるようになった⁷²。フッ素原子の導入前後で抗菌スペクトルや薬剤の性質が大きく異なることから、フッ素を導入したキノロン系薬は、

ニューキノロン系薬と呼ばれている。

キノロン低感受性 *H. influenzae* は、*gyrA* あるいは *gyrA* と *parC* の両方に変異を有している^{60, 73)}。すなわち、キノロン低感受性株は、すべて DNA gyrase に変異を有している。そこで、DNA gyrase のみに作用するオールドキノロン系薬を使用することで、キノロン低感受性株のみを検出できるとの仮説を立てた。薬剤感受性試験には、先述した微量液体希釈法の他に、簡易法としてディスク拡散法がある^{68, 74)}。この手法では、寒天培地に試験菌を塗抹し、その上に薬剤含有ろ紙（ディスク）を乗せ、適切な時間培養し、阻止円の大きさを測定することで感受性を判定する⁷⁴⁾。本法は、手順が非常に簡単かつ安価であり、通常の培養設備さえあれば阻止円の大きさで感受性が識別できる。

そこで、本章では、簡便で安価かつ臨床でも実施可能な方法として、オールドキノロンを含有するディスク拡散法によるキノロン低感受性株の簡易検出法について検討した。

【 材 料 ・ 方 法 】

1. 使用菌株

菌株は、2016～2018 年間に分離され、当教室に保管されていた *H. influenzae* 臨床分離株のうち、過去の研究で使用されたすべてのキノロン低感受性株 17 株と同数のランダムに選択した感受性株 16 株を使用した (Table 1)^{38, 39, 56)}。分離年の内訳は、2016 年が 6 株 (低感受性株 3 株, 感受性株 3 株), 2017 年が 10 株 (低感受性株 4 株, 感受性株 6 株), 2018 年が 17 株 (低感受性株 10 株, 感受性株 7 株) であった。また、抗菌薬感受性試験の基準株として、CLSI に規定されている *H. influenzae* ATCC 49247 を使用した⁶³⁾。

2. 培養条件

菌株の培養にはチョコレート寒天培地を使用し、37°C, 18～24 h 培養した。チョコレート寒天培地は、5 mg/mL yeast extract (Oxoid) 含有 brain heart infusion (BHI) broth (Oxoid) に、agar bacteriological (Oxoid) と defibrinated horse blood (Nippon Bio-Test Laboratories) をそれぞれ 1.5%, 5%となるように加え、75～80°C の湯浴で 20 min 攪拌したのち、 β -nicotinamide-adenine dinucleotide (β -NAD, FUJIFILM-Wako Chemical) を 15 μ g/mL となるように加えて作成した。菌株は、10% skim milk (Becton Dickinson) 中に濃厚に懸濁し、-80°C で使用時まで凍結保存した。

3. ディスク拡散法

3-1. 使用ディスク

薬剤ディスクは、LVX ディスク (5 μ g/disc Eiken Chemical), NOR ディスク (10 μ g/disc Eiken Chemical), NA ディスク (30 μ g/disc Becton Dickinson), PPA ディスク (30 μ g/disc Eiken Chemical) を使用した。

3-2. ディスク拡散法

チョコレート寒天培地で 18～24 h 培養した菌を、チョコレート寒天培地に滅菌綿棒を用いて均等に塗り広げ、その上に適当な間隔でそれぞれのディスクを置いた。37°C で一晩培養後、阻止円の直径を計測した。

Table 1. Clinical features and quinolone resistance phenotype and genotype of bacterial strains used in this study

Strain	Prefecture	Clinical department	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			Amino acid substitution	
			LVX	TFX	NOR	GyrA	ParC
ATCC 49247			0.016	0.008	0.063	-	-
2017-Y25	Kanagawa	Pediatrics	0.008	0.008	0.063	-	-
2016-8	Tokyo	Pediatrics	0.008	0.004	0.032	-	-
2018-Y31	Kanagawa	Pediatrics	0.008	0.008	0.032	-	-
2018-Y41	Kanagawa	Pediatrics	0.008	0.008	0.032	-	-
2016-16	Tokyo	Pediatrics	0.016	0.016	0.032	-	-
2016-32	Tokyo	Pediatrics	0.016	0.008	0.032	-	-
2017-Y10	Kanagawa	Pediatrics	0.016	0.008	0.032	-	-
2017-Y20	Kanagawa	Pediatrics	0.016	0.016	0.063	-	-
2017-Y50	Kanagawa	Pediatrics	0.016	0.008	0.032	-	-
2018-Y1	Kanagawa	Pediatrics	0.016	0.008	0.063	-	-
2018-Y6	Kanagawa	Pediatrics	0.016	0.008	0.032	-	-
2018-Y9	Kanagawa	Pediatrics	0.016	0.008	0.032	-	-
2018-Y10	Kanagawa	Pediatrics	0.016	0.016	0.063	-	-
2018-Y23	Kanagawa	Otolaryngology	0.016	0.008	0.032	-	-
2017-Y9	Kanagawa	Cardiology	0.032	0.016	0.063	-	-
2017-Y45	Kanagawa	Pediatrics	0.032	0.016	0.063	-	-
2018-Y38	Kanagawa	Pediatrics	0.125	0.063	0.25	Ser84Leu	-
2016-24	Tokyo	Pediatrics	0.125	0.125	0.25	Ser84Leu	-
2017-Y31	Kanagawa	Pediatrics	0.125	0.125	0.5	Ser84Leu	-
2018-Y37	Kanagawa	Pediatrics	0.125	0.125	0.5	Ser84Leu	-
2018-Y49	Kanagawa	pediatrics	0.125	0.125	0.5	Ser84Leu	-
2018-Y57	Kanagawa	Pediatrics	0.125	0.125	0.25	Ser84Leu	-
2017-Y28	Kanagawa	Pediatrics	0.125	0.25	0.5	Ser84Leu	-
2018-Y43	Kanagawa	Pediatrics	0.5	0.25	1	Ser84Leu	-
2017-Y11	Kanagawa	Pediatrics	0.5	0.5	> 2	Ser84Leu	Glu88Lys
2016-90	Tokyo	Pediatrics	0.5	1	2	Ser84Leu	Asp83Asn
2016-82	Tokyo	Respiratory medicine	0.5	2	> 2	Ser84Leu	Ser84Arg
2018-Y20	Kanagawa	Pediatrics	0.5	2	> 2	Ser84Leu	Ser84Ile
2018-Y32	Kanagawa	Pediatrics	0.5	2	> 2	Ser84Leu	Ser84Ile
2018-Y34	Kanagawa	Pediatrics	0.5	2	> 2	Ser84Leu	Ser84Ile
2018-Y40	Kanagawa	Pediatrics	0.5	2	> 2	Ser84Leu	Ser84Ile
2018-Y46	Kanagawa	Pediatrics	0.5	2	> 2	Ser84Leu	Ser84Ile
2017-Y55	Kanagawa	Respiratory medicine	1	2	> 2	Ser84Leu	Ser84Ile

LVX, levofloxacin; TFX, tosufloxacin; NOR, norfloxacin; -, no substitution

4. PCR法による低感受性株の検出

4-1. PCR法による Ser84Leu の検出

Ser84Leu 検出の PCR は、Seyama らの方法で行った⁶⁷⁾。PCR 試料は、寒天培地上の *H. influenzae* のシングルコロニーを TE buffer 50 μ L に懸濁後、95°C で 5 min の加熱処理を行った PCR 用菌液を用いた。PCR チューブに、Go Taq[®] Green Master Mix (Promega) 5 μ L, 合成プライマー gyrA-w-F1 (5'-ATCACCCGCATGGTGACGC-3'), gyrA-w-F2 (5'-TAAATATCATCCTCACGGCGATGC-3'), gyrA-w-R (5'-GTTTGGCGAGAAATTGACGG-3') を各 10 pmol, PCR 用菌液 1 μ L を加え、nuclease-free water (Promega) にて全量を 10 μ L とした。混合した後、DNA thermal cycler を用いて、95°C, 30 sec の変性、56°C, 30 sec のアニーリング、72°C, 30 sec の伸長反応という一連の行程を 30 cycles 行った。増幅した PCR 産物 2 μ L を後述する agarose ゲル電気泳動に供し、DNA の増幅が確認できた株は野生型とし、確認できなかった株は変異型と判定した。プライマーの合成は、Hokkaido System Science に依頼した。

4-2. Agarose ゲル電気泳動法

2% agarose ゲルを用い、TAE buffer [40 mM Tris-acetate (pH8.2), 2 mM EDTA2Na] 中で、100 V, 30 min の電気泳動を行った。ゲル作成用 agarose は、KANTO CHEMICAL あるいは NIPPON GENE のものを用いた。電気泳動装置は、水平型電気泳動槽-Mupid (Cosmo Bio) を使用した。泳動後、100 μ g/mL ethidium bromide (FUJIFILM-Wako Chemical) でゲルを 15 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 1 kbp DNA ladder (NIPPON genetics) と泳動距離を比較することで確認した。

5. 統計解析

統計学的解析は、EZR を用いて Kruskal-Wallis test with Bonferroni correction により検定した。 $P < 0.05$ の場合に、統計学的に有意とした⁷⁵⁾。

【 結 果 】

1. 各種キノロン系薬に対する阻止円径とキノロン感受性の関連

キノロン感受性株と低感受性株間の阻止円径を比較したところ、キノロン感受性株では LVX ディスクで 17.5 から 29.2 mm, NOR ディスクで 18.2 から 29.5 mm, NA ディスクで 14.1 から 25.6 mm, PPA ディスクで 14.0 から 21.0 mm の明瞭な阻止円の形成が認められた (Figure 6)。キノロン低感受性株では, LVX ディスクで 13.8 から 24.0 mm, NOR ディスクで 10.0 から 22.8 mm の阻止円が認められ, 感受性株のそれらよりも径が縮小しているものの, 明瞭な阻止円が認められた (Figure 6A, B)。一方, NA ディスクを用いた場合, 阻止円はすべての低感受性株で検出限界以下となった (Figure 6C)。PPA ディスクを用いた場合は, 低感受性株のうち 10 株は阻止円が検出されず, 7 株は 9.0 から 11.6 mm の阻止円を形成した (Figure 6D)。阻止円が認められた 7 株の LVX の MIC は, すべて 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

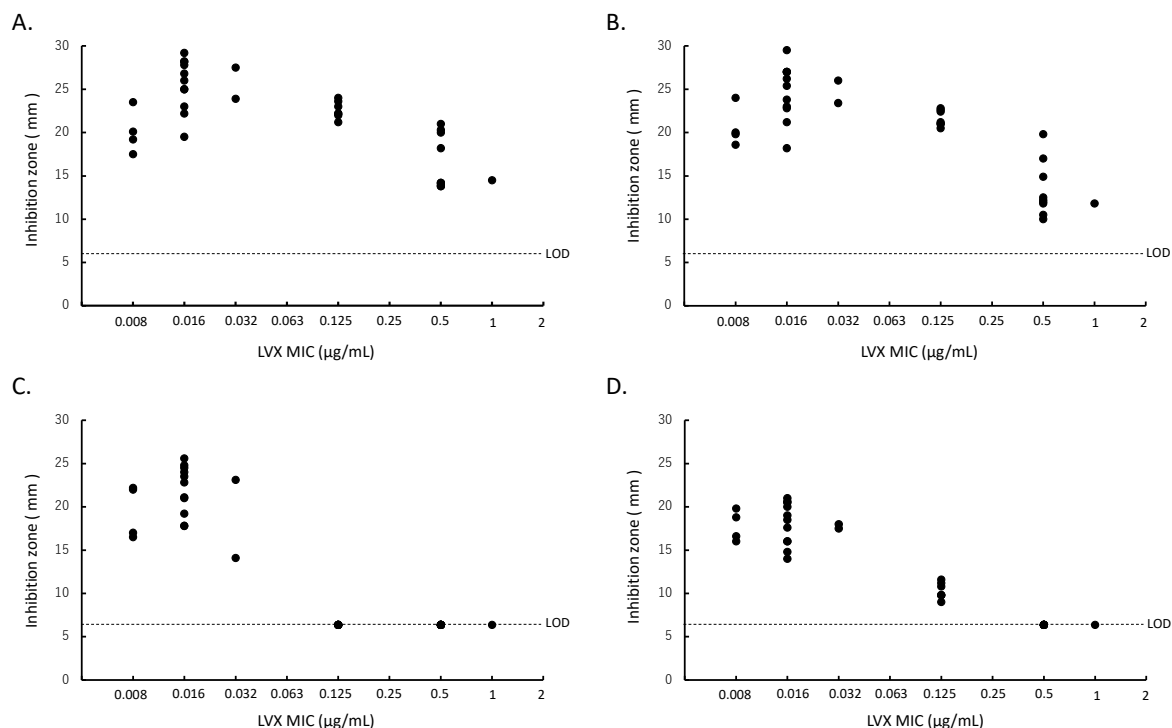


Figure 6. Disc diffusion test using quinolone discs.

Inhibitory zone diameter for each *H. influenzae* strain. A. Levofloxacin (LVX) disc (5 $\mu\text{g}/\text{disc}$); B. Norfloxacin (NOR) disc (10 $\mu\text{g}/\text{disc}$); C. Nalidixic acid (NA) disc (30 $\mu\text{g}/\text{disc}$). The 0.125 and 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dots represent seven and nine strains with the same MIC, respectively. D. Pipemidic acid (PPA) disc (30 $\mu\text{g}/\text{disc}$). The 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dot represents nine strains with the same MIC.

LOD, limit of detection (6.35 mm).

2. QRDR のアミノ酸置換と阻止円径の関連

QRDR のアミノ酸置換数と阻止円径の関連を解析した。その結果、LVX ディスクと NOR ディスクでは、*gyrA* 単独変異株の阻止円径は、QRDR に変異を持たない株と同様の値となったことから、低感受性株の検出は難しいことが示された (Figure 7A, B)。一方、NA ディスク使用時は、*gyrA* 単独変異株および *gyrA* と *parC* の両方に変異を有する株で阻止円は完全に消失しており (Figure 7C), *gyrA* に変異のない株と明瞭に区別可能であった (Figure 8)。さらに、PPA ディスクを使用した場合、*gyrA* と *parC* の両方に変異を有する株で阻止円が全く形成されず (Figure 7D), *gyrA* 単独変異株とも明瞭に区別可能であることが示された (Figure 8)。

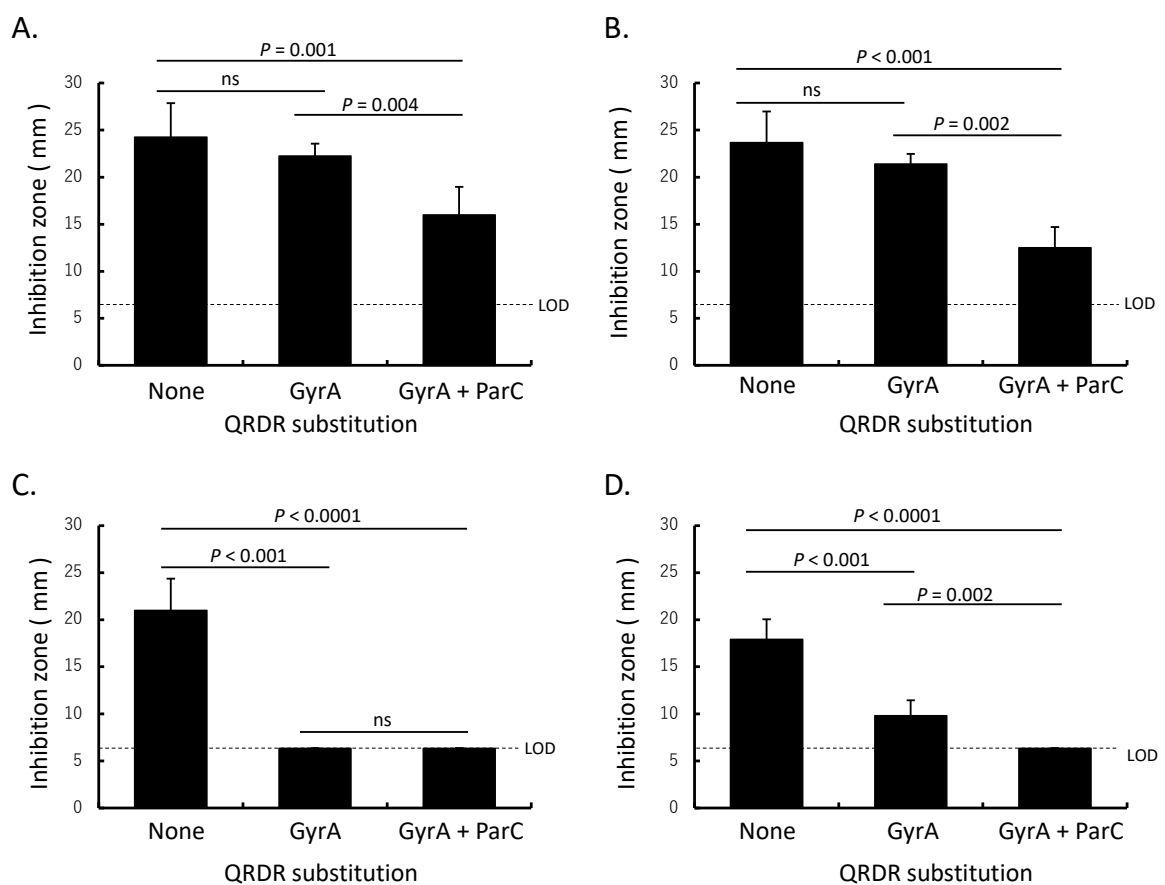


Figure 7. Association between inhibitory zone diameter and amino acid substitutions in quinolone resistance-determining regions (QRDRs).

A. LVX disc (5 µg/disc); B. NOR disc (10 µg/disc); C. NA disc (30 µg/disc); D. PPA disc (30 µg/disc). P value was determined by Kruskal-Wallis test with Bonferroni correction for multiple comparisons.

LOD, limit of detection (6.35 mm).

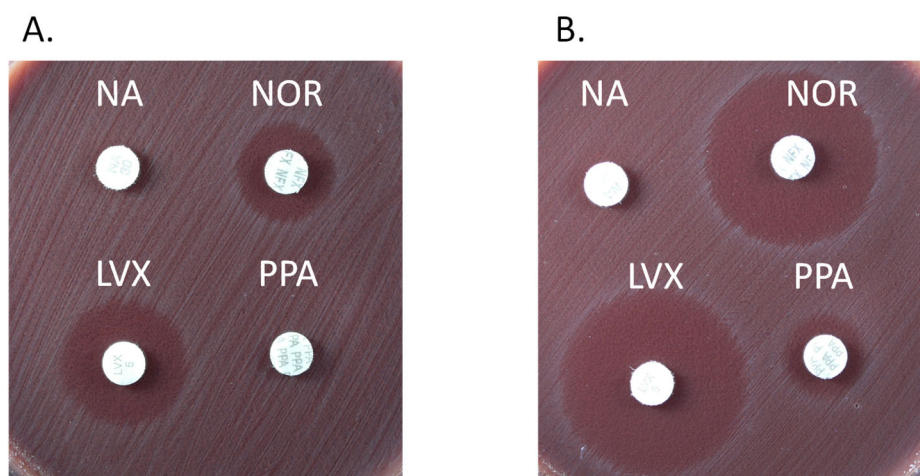


Figure 8. Representative results for the disc diffusion test.

A and B indicate the results of quinolone low-susceptibility isolate 2018-Y46, which had amino acid substitutions in both GyrA and ParC, and 2018-Y49, which had amino acid substitutions in GyrA, respectively.

3. オールドキノロン系薬を用いたディスク拡散法の精度

オールドキノロン系薬を用いたディスク拡散法の精度を検証するために、感度、特異度、陽性適中率を算出した。NA ディスクを使用した場合、すべてのキノロン低感受性株で阻止円が検出限界以下となり、感度、特異度、陽性適中率はいずれも 100%であった。この結果は、既報の PCR 法の結果とも一致していた。

PPA ディスクを用いた場合、*gyrA* と *parC* に変異を有する株を検出できる特異度は 90%、感度および陽性適中率は 100%であった。

【 考 察 】

本章では、臨床現場において、キノロン低感受性 *H. influenzae* を簡易的かつ高精度に検出することを目的とし、ディスク拡散法を用いた検出法を開発した。

LVX や NOR ディスクを使用したところ、感受性株および低感受性株の両方で阻止円が形成された。感受性株の阻止円の平均径は低感受性株のそれよりも大きいものの、感受性株と低感受性株の差異を明確にする基準を設定することができなかった。一方、NA ディスクを使用した場合、すべての低感受性株で阻止円が消失した。これは、NA が DNA gyrase のみに作用することに起因すると考えられた。NA を用いた検査の感度、特異度、陽性適中率はいずれも 100 % であり、低感受性株の検出に適切であることが示された。このディスク拡散法での低感受性株の検出法は既存の PCR 法⁶⁷⁾と同等の結果となっており、遺伝子検査および詳細な感受性検査を実施しなくても、低感受性株を検出できることが示された。PCR 法は、*gyrA* の QRDR 中に変異がある場合に PCR で増幅が出来ないように primer が設計されている⁶⁷⁾。しかしながら、設計された primer 部分に耐性に関与しない変異を持つ株が出現した場合、この手法は使用できない。これに対して、ディスク拡散法はキノロン系薬に対する耐性を遺伝子解析ではなく表現型で判定しているため、抗菌薬への実質的な菌株の感受性を評価している。つまり、検出系としての高い感度を維持できることから、既存の PCR 法よりも有用な検査法になることが期待できる。加えて、一般的にディスク拡散法は、阻止円径を測定し感受性を判定するので、測定者によって測定誤差が生じやすい。しかしながら、本研究で構築した手法は、判定を阻止円の有無で行うことができるため、熟練者でなくても簡単に試験を行うことが可能であり、臨床への応用度が高い方法と考えられた。さらに、PPA ディスクを使用した場合、*gyrA* 単独変異株では阻止円を形成したのに対し、*gyrA* と *parC* の両方に変異を有する株では阻止円が消失した。PPA は NA と同じオールドキノロン系薬でありながら、ニューキノロン系薬に類似した構造を有するため⁶⁹⁾、topoisomerase IV に対しても親和性を有し、*gyrA* 単独変異株に抗菌活性を示したと考えられた。PPA ディスクを用いて、*gyrA* と *parC* の両方に変異を有する菌株を検出すると、その精度評価は、特異度が 90%、感度および陽性適中率は 100 % であった。すなわち、NA ディスクに加え PPA ディスクを併用することで、塩基配列を解析しなくても *gyrA*、*parC* のキノロン耐性に関与する変異の有無を簡便に評価できることが可能となった。

本章の結果から、NA を用いたディスク拡散法でキノロン低感受性株を、明瞭かつ高感度に検出できることが明らかとなった。加えて、PPA ディスクを用いた試験を併用することで、*parC* の変異の有無についても判定できることが示された。本手法を感受性測定に用いることで、低感受性株を正確に判定でき、不用意なキノロンの投与を避けることが可能になると期待される。

第 2 章

遺伝子水平伝播を介したキノロン低感受性株の出現機構の解析

第 1 節

キノロン低感受性 *Haemophilus influenzae* の水平伝播機構の解析

【 背 景 】

一般的な細菌において、自然界で点突然変異が起こる頻度は $10^{-8} \sim 10^{-7}$ 程度と必ずしも高くない⁷⁶⁾。キノロン耐性化は段階的な点変異に起因するとされているが^{58, 62, 77)}、近年、*H. influenzae* においてキノロン低感受性株が急増しているため、キノロン耐性化には点変異だけではなく、別経路の存在が考えられた。

Haemophilus 属菌は高い自然形質転換能をもち、外来の遊離 DNA を取り込むことが知られている⁷⁸⁻⁸²⁾。この自然形質転換には、受容菌の IV 型線毛による uptake signal sequence (USS) の認識が重要とされている^{80, 82)}。USS は 9 bp の短い繰り返し配列 (5'- AAGTGCGGT-3') であり、*Haemophilus* 属菌の染色体上に 2,000~3,000 bp に 1 つ程度の頻度で存在している。

そこで、本章では、点変異以外の要因として、自然形質転換によるキノロン耐性の水平伝播が関与するとの仮説を立て、キノロン低感受性 *H. influenzae* の水平伝播機構について検討した。

【 材 料 ・ 方 法 】

1. *gyrA* の系統解析

菌株は、2016～2019 年の間に分離され、当教室に保管されていた *H. influenzae* 臨床分離株のうち、Table 2 に示すキノロン低感受性株ならびに耐性株 14 株を使用した。QRDR を含む *gyrA* の multiple alignment は、GENETYX ver. 10 (Genetyx) を用いて作成した。系統樹は、Geneious prime 2019 (Biomatters) 内の Clustal omega program を用い Tamura-Nei neighbour-joining method で作成した。

Table 2. *H. influenzae* strains used in phylogenetic analysis

Strain	ST	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		Amino acid substitutions	
		LVX	TFX	GyrA	ParC
2016-20	1856	4	8	Ser84Phe / Asp88Asn	Glu88Lys
2016-24	107	0.125	0.125	Ser84Leu	Asn138Ser
2016-82	2336	0.5	2	Ser84Leu	Ser84Arg / Asn138Ser
2017-Y11	156	0.5	0.5	Ser84Leu	Glu88Lys
2017-Y31	107	0.125	0.125	Ser84Leu	-
2017-Y55	422	1	2	Ser84Leu	Ser84Ile
2018-Y34	422	0.5	2	Ser84Leu	Ser84Ile
2018-Y37	107	0.125	0.125	Ser84Leu	-
2018-Y38	107	0.125	0.063	Ser84Leu	-
2018-Y40	422	0.5	2	Ser84Leu	Ser84Ile
2018-Y43	2055	0.5	0.25	Ser84Leu	-
2018-Y49	1002	0.125	0.125	Ser84Leu	-
2018-Y57	107	0.125	0.125	Ser84Leu	-
2019-52	395	0.125	0.125	Ser84Leu	-

ST, sequence type; LVX, levofloxacin; TFX, tosufloxacin; -, no substitution

2. 水平伝播実験

2-1. 使用菌株

供与菌として、キノロン標的酵素にアミノ酸置換を有する 2018-Y40 (ST422) と 2018-Y38 (ST107) を使用した (Table 2) ^{56, 83)}。また、受容菌として *H. influenzae* の研究において古くから実験室株として使用されてきた Rd 株 ⁸⁴⁾ と、様々な ST の臨床分離株 4 株 (2017-18B, 2017-22B, 2018-Y17, 2019-6) を使用した。

2-2. 水平伝播実験

受容菌を対数増殖期 ($\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 2.0\text{-}3.0$) まで培養し、10 倍に濃縮したものを 50 μL 、BHI に $\beta\text{-NAD}$ と hemin を 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように加えた supplemented BHI (sBHI) 寒天培地の中央に添加した。乾燥後、本章第 1 節 - 【材料・方法】 - 2 - 3 で

作成した供与菌の培養上清 50 μL もしくは本章第 1 節 - 【材料・方法】 - 2 - 4 で作成した fragment を 30 ng 重層し、37°C で一晚培養した。発育した菌を 1 mL の sBHI broth 中に懸濁し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nalidixic acid もしくは 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pipemidic acid 含有チョコレート寒天培地に塗布した。得られたコロニー数を、培養上清あるいは fragment 非添加時のコントロールと比較した。また、得られたコロニーのキノロン標的遺伝子を、本章第 1 節 - 【材料・方法】 - 3 に示す方法で解析し、組換えの有無を確認した。

2-3. 添加培養上清の作成

チョコレート寒天培地上で培養した供与菌のシングルコロニーを 10 mL の sBHI broth に接種し、37°C で一晚培養した。培養液中の生菌を 0.2 μm のメンブランフィルター (Toyo Roshi Kaisha) で除去したのち、等量の 10 % polyethylene glycol (PEG) 8000 / 0.3 M NaCl 溶液と混合し、4°C で一晚静置した。これを、6,700 $\times g$ で 30 min 遠心分離し、上清中の微粒子を 10 倍に沈澱濃縮した。作成した培養上清は、4°C で保管した。培養上清中の *gyrA* ならびに *parC* の検出は、培養上清 1 μL をテンプレートとした nested PCR で行った。Go Taq[®] Green Master Mix 5 μL 、合成プライマー *gyrA*-seq-F, *gyrA*-seq-R または *parC*-seq-F, *parC*-seq-R (Table 3) を各 10 pmol を加え、nuclease-free water にて全量を 10 μL とした。混合した後、DNA thermal cycler を用いて、95°C, 15 sec の変性、50°C, 15 sec のアニーリング、72°C, 30 sec の伸長反応という一連の行程を 25 cycles 行った。PCR 産物を電気泳動で確認したのち、nuclease-free water で 10 倍に希釈した PCR 産物をテンプレートとして、上述と同様の条件で再度 PCR を行った。また、培養上清中の組換え原因物質の検討には、TritonX-100 と DNase I (Takara-Bio) を使用した。TritonX-100 と DNase I は、培養上清にそれぞれ 0.1%, 1 U となるように添加した。

2-4. 添加 DNA fragment の作成

水平伝播実験に使用したキノロン標的遺伝子の fragment は、供与菌である 2018-Y40 の *gyrA* もしくは *parC* 領域を PCR で増幅した。2018-Y40 株のシングルコロニーを TE buffer で懸濁し、95°C で 5 min 処理したものを PCR 用菌液とした。Q5 High-Fidelity 2 \times Master Mix (Bio Labs) 25 μL 、合成プライマー (Table 3) を各 10 pmol、テンプレート 1 μL を加え、nuclease-free water にて全量を 50 μL とした。混合した後、DNA thermal cycler を用いて、98°C, 30 sec の変性、52°C, 30 sec のアニーリング、72°C, 2 min 30 sec の伸長反応という一連の行程を 25 cycles 行った。増幅産物は、GEL/PCR Purification Mini Kit (Favorgen) を用いて精製した。濃度は、QuantiFluor ONE dsDNA System (Promega) あるいは Quantus Fluorometer (Promega) を用いて測定した。

2-5. Prophage 欠損株の作成

2018-Y40 株はゲノム上に 4 つの完全な prophage 領域を保有している⁸³⁾ (Figure 9)。これらの prophage 領域の欠損株は、後述のように作成した。欠損させる遺伝子の上流、下流約 1.5 kbp を Table 3 に記したプライマー (upstream-F, R, downstream-F, R) を用いて PCR で増幅した。Q5 High-Fidelity 2× Master Mix を 25 μ L, 各プライマーを各 10 pmol, PCR 用菌液 1 μ L を加え, nuclease-free water にて全量を 50 μ L とした。混合した後, DNA thermal cycler を用いて, 98°C, 30 sec の変性, 50°C, 15 sec のアニーリング, 72°C, 1 min の伸長反応という一連の行程を 30 cycles 行った。次に, β -ラクタム耐性遺伝子である *bla*_{TEM-1} を prophage の上流と下流の 20 bp を含むプライマー (TEM-F, R) で増幅した。この時, テンプレートは *bla*_{TEM-1} 保有株である 2017-Y22 株のコロニーから本章第 1 節 - 【材料・方法】 - 2 - 4 の方法で調製した PCR 用菌液を用いた。これらの PCR 産物を GEL/PCR Purification Mini Kit を用いて精製し, 混合したものをテンプレートとして用い, upstream-F と downstream-R のプライマーで再度増幅させることで, β -ラクタム耐性遺伝子を含むカセットを作成した。Q5 High-Fidelity 2× Master Mix 25 μ L, 各合成プライマーを各 10 pmol を加え, nuclease-free water にて全量を 50 μ L とした。混合した後, DNA thermal cycler を用いて, 98°C, 30 sec の変性, 50°C, 15 sec のアニーリング, 72°C, 2 min 30 sec の伸長反応という一連の行程を 30 cycles 行った。

形質転換に使用する 2018-Y40 株のコンピテントセルの作成は, Ubukata らの方法を改変して行った³⁶⁾。2018-Y40 のシングルコロニーを sBHI broth に懸濁し, 37°C で一晚培養した。培養した菌を 100 倍希釈し, OD_{600 nm} = 3.0 になるまで 37 °C, 150 rpm の条件で振とう培養した。5,000 \times g, 5 min で遠心分離して集菌し, 上清を捨て, SG buffer (10% glycerol, 10% sucrose) で懸濁し, 再度遠心分離することで菌を洗浄した。洗浄後, SG buffer で再懸濁したものをコンピテントセルとした。形質転換は, エレクトロポレーション法で行った。2018-Y40 株のコンピテントセルに β -ラクタム耐性遺伝子を含むカセットを約 1 μ g 加え, 混合し, 氷冷した。これを氷冷した electroporation cuvette (Bio Rad) に移した。エレクトロポレーションは, Gene Pulser II (Bio Rad) を用いて, 1.25 kV/cm, 25 μ F, 200 Ω の条件で行った。通電後, 1 mL の sBHI broth に再懸濁し, 37 °C で一晚培養したのち, 50 μ g/mL の AMP 含有チョコレート寒天培地に塗布した。

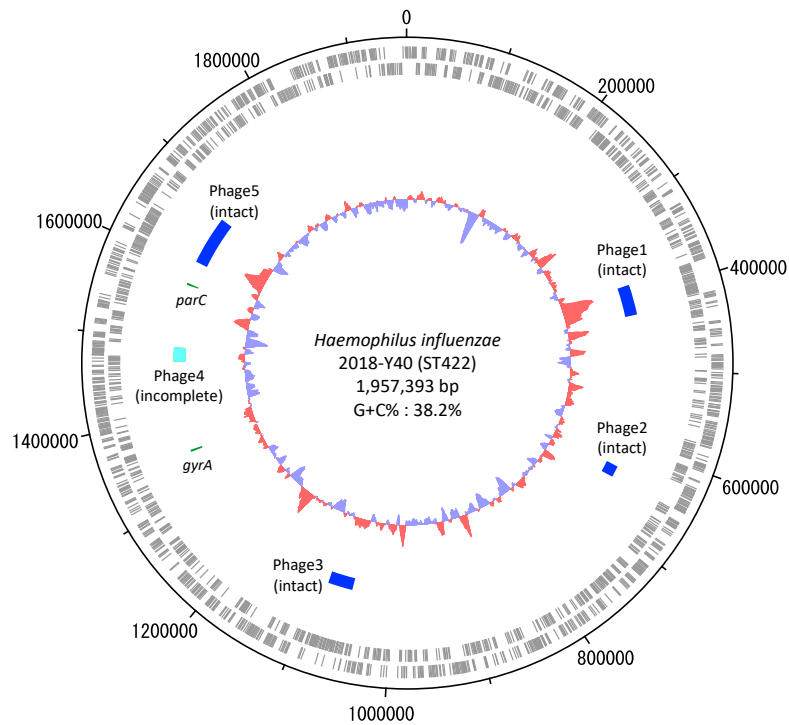


Figure 9. Circular map of the *Haemophilus influenzae* 2018-Y40 whole-genome sequence. The outermost circle shows the number of nucleotides. The second and third outermost grey circles show coding sequences on the plus and minus strands, respectively. The innermost circle represents the GC content (%). The blue and light blue zones show the locations of prophage regions, and the green zones show the locations of *gyrA* and *parC*. GC, guanine–cytosine. (Tanaka et al. J Glob Antimicrob Resist. 22 (2020) 759-761 より引用⁸³⁾)

Table 3. Primers used for horizontal gene transfer assay

Primer	Sequence (5' to 3')	Description
gyrA-F	atgacggattcaatccaatc	Construction of <i>gyrA</i> fragment
gyrA-R	cagtttgataccacgaac	
gyrA-R2	ttcaatttcgaccgcacttcc	
gyrA-R3	atttaagtctaataatgatgcttc	
gyrA-R4	gaagcgggttaaaatagcac	
parC-upstream-F	gtggctcgcaggatttag	Construction of <i>parC</i> fragment
parC-F	atgacaaatatcaactatgaag	
parC-R	caataaaatatgaggtaaaccg	
parC-R2	ctcgcctcttcttttttc	
parC-R3	ccgatcatattcatatttac	
parC-R4	catcggcttgttcatctc	
parC-R5	actggctctgctggcgtc	
parC-R6	catattcaatggctgcacc	
parC-R7	tggaaaaatcaacattctgc	
1-upstream-F	gttaataatagcgtatgcc	Construction of phage1 knockout strain
1-upstream-R	cgaacaacctgagattaag	
1-downstream-F	caataatgcgattaatctgc	
1-downstream-R	gttaagtacacagcaaacc	
1-TEM-F	cttaatctcaggtgttcgaattcttgaagacgaaaggg	
1-TEM-R	gcagatttaatcgattattgtttataatgtgtactttaatgc	
2-upstream-F	aatgcaggagcgaaagaag	Construction of phage2 knockout strain
2-upstream-R	tataaccaatttacttctcgc	
2-downstream-F	gaaccaataagccttactc	
2-downstream-R	actaaattcttagtaagcgc	
2-TEM-F	gcgagaagtaaattggtataaattcttgaagacgaaaggg	
2-TEM-R	gagtaaggcttattggtctttataatgtgtactttaatgc	
3-upstream-F	cagtgtaaaacttatgtcatc	Construction of phage3 knockout strain
3-upstream-R	taaacgctctttaaatctcc	
3-downstream-F	atcagccaccttagtcttg	
3-downstream-R	gggtacatatctttatttg	
3-TEM-F	ggagatttaaagagcgtttaaattcttgaagacgaaaggg	
3-TEM-R	caagactaagggtggctgattttataatgtgtactttaatgc	
5-upstream-F	ttctcaatttcgctttgg	Construction of phage5 knockout strain
5-upstream-R	ataattctcaaataatattatg	
5-downstream-F	cgaaatcgatccaatcg	
5-downstream-R	gagaatttgcgaaattgag	
5-TEM-F	catataatatttgagaattataatcttgaagacgaaaggg	
5-TEM-R	cgattgggatcgatttcgtttataatgtgtactttaatgc	
gyrA-seq-F	ccgccgcgtactgtct	For <i>gyrA</i> sequence
gyrA-seq-R	ccatttgctaaaagtgc	
parC-seq-F	tggtttaaaacccgttca	For <i>parC</i> sequence
parC-seq-R	agcaggtaaatattgtgg	

3. キノロン標的遺伝子の解析

3-1. PCR 法による標的遺伝子の増幅

PCR のテンプレートとして、本章第 1 節 - 【材料・方法】 - 2 - 4 の方法で調製した PCR 用菌液を用いた。Go Taq[®] Green Master Mix 5 μ L, 合成プライマー gyrA-seq-F, gyrA-seq-R または parC-seq-F, parC-seq-R (Table 3) を各 10 pmol, PCR 用菌液 1 μ L を加え, nuclease-free water にて全量を 10 μ L とした。混合した後, DNA thermal cycler を用いて, 95°C, 15 sec の変性, 50°C, 15 sec のアニーリング, 72°C, 30 sec の伸長反応という一連の行程を 25 cycles 行った。PCR 産物は, 電気泳動で確認した。

3-2. PCR 産物の精製

PCR 産物の精製は, EnzSAP (EdgeBio) を用いた。PCR 産物の 40% の EnzSAP を加えて, 37°C, 5 min の反応後, 80°C, 15 min で処理したものを PCR 精製物とした。

3-3. シーケンス反応

シーケンス解析は, eurofins genomics に依頼した。サンプルは PCR 精製物 2 μ L, プライマー 9.6 pmol を混合し, 滅菌超純水で全量が 21 μ L になるように調製し eurofins genomics に送付した。

3-4. 塩基配列の解析

得られた塩基配列は, DNA Sequencing Analysis ソフトウェア ver. 5.1 (Thermo Fisher Scientific) および, DNA 解析プログラム GENETYX ver. 10 を用いた。

4. 抗菌薬感受性試験

4-1. 使用薬剤

抗菌薬は, LVX (Tokyo Chemical Industry), tosufloxacin (TFX, FUJIFILM-Wako Chemical) を使用した。

4-2. 抗菌薬感受性試験

抗菌薬感受性は, CLSI の方法に基づき微量液体希釈法で測定した⁶³⁾。Defibrinated horse blood (JAPAN LAMB) を完全に溶血するまで凍結融解を繰り返し, 17,000 \times g で 20 min 遠心分離し, 上清を lysed horse blood (LHB) とした。Mueller-Hinton broth (MHB, Oxoid) に Ca²⁺ が 20 μ g/mL, Mg²⁺ が 10 μ g/mL となるように添加した cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) に, 最終濃度が 2.5% になるように LHB を加えた。さらに, β -NAD を 15 μ g/mL となるように CAMHB に添加して測定用培地とした。続いて, チョコレート寒天培地で 18~24 h 培養した菌を, MHB に McFarland standard 0.5 と同等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 μ L に菌液 1 μ L を MIC ミニ (Medi Science) あるいは 96 ピンプレート (Stem) を用

いて接種した。37°C, 20~24 h 好気培養後に菌の発育を判定し, 各抗菌薬の MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を判定した。LVX 感受性の breakpoint は CLSI の基準を使用し, $\leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ とした。また, LVX 低感受性株の breakpoint は既報に基づき, $0.063 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ とした⁶⁷⁾。

5. 統計解析

統計学的解析は, EZR を用いて one-way ANOVA test with Bonferroni correction あるいは Welch's *t* test により検定した。 $P < 0.05$ の場合に, 統計学的に有意とした⁷⁵⁾。

【 結 果 】

1. *gyrA* の系統解析

キノロン感受性株における *gyrA* の多様性を明らかにするために、14 株の臨床分離株について *gyrA* の QRDR (約 300 bp) の系統解析を行った (Figure 10)。使用した菌株の multiple alignment を作成したところ、アミノ酸置換を伴う変異は 4 か所であったのに対し、サイレント変異が多数認められた (Figure 10A)。そこで、Tamura-Nei neighbour-joining method で分子系統樹を作成し、ST との関連を併せて検討した。その結果、これらの *gyrA* は、複数のクラスターに分類されることが明らかとなった (Figure 10B)。さらに、遺伝学的背景が同じとされる同一の ST や clonal complex (CC) の株でも異なるクラスターに分類された。すなわち、低感受性株の *gyrA* が点突然変異によって生じたもの以外に、外部から獲得したものも存在する可能性が示された。

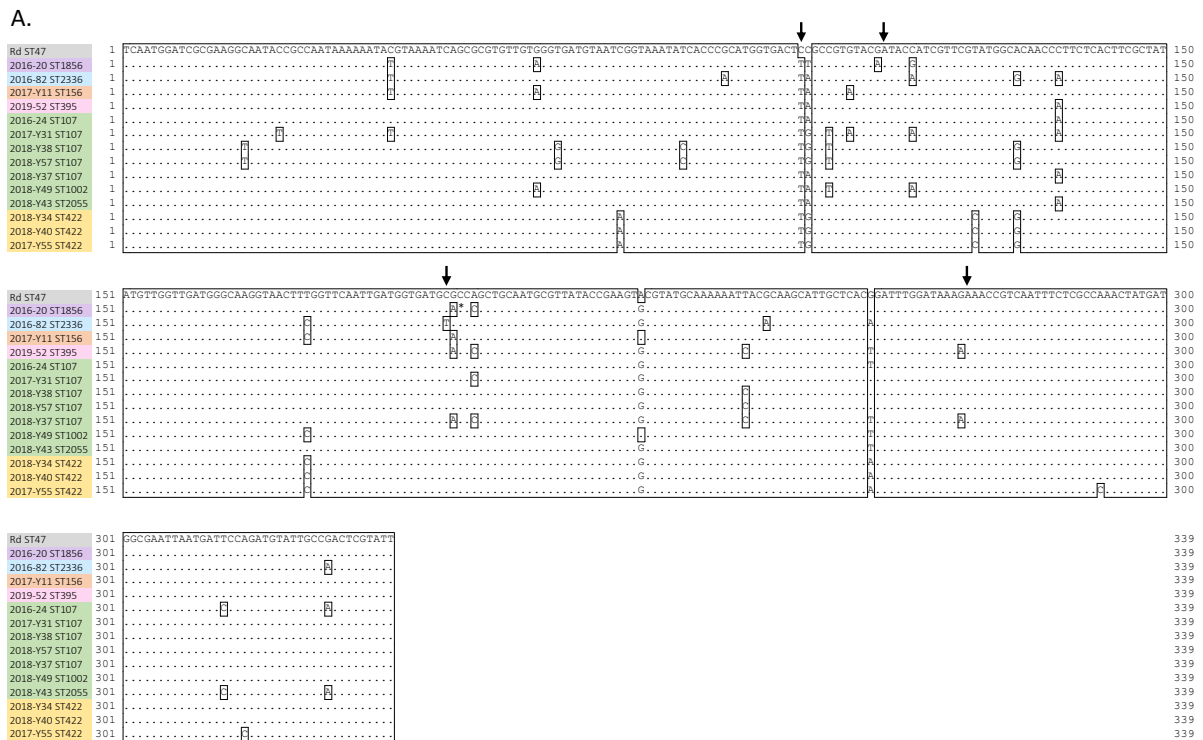


Figure 10. Phylogenetic analysis of *H. influenzae* strains harbouring amino acid substitutions in QRDRs of *gyrA*.

A. Sequence alignment map. ST indicates the multilocus sequence typing. The matches and mismatches in the isolate sequences compared to *H. influenzae* Rd strain sequence are indicated by dots and nucleotide bases, respectively. The arrows represent the middle base of a codon that results in amino acid substitution. * indicates no change in amino acid. Color coding indicates strains of a same ST or clonal complex. B. Dendrogram based on the nucleotide sequences shown in Fig. 9A, using Clustal Omega program and the neighbor-joining method. Color coding indicates strains of a same ST or clonal complex. * indicates putative outbreak strain.

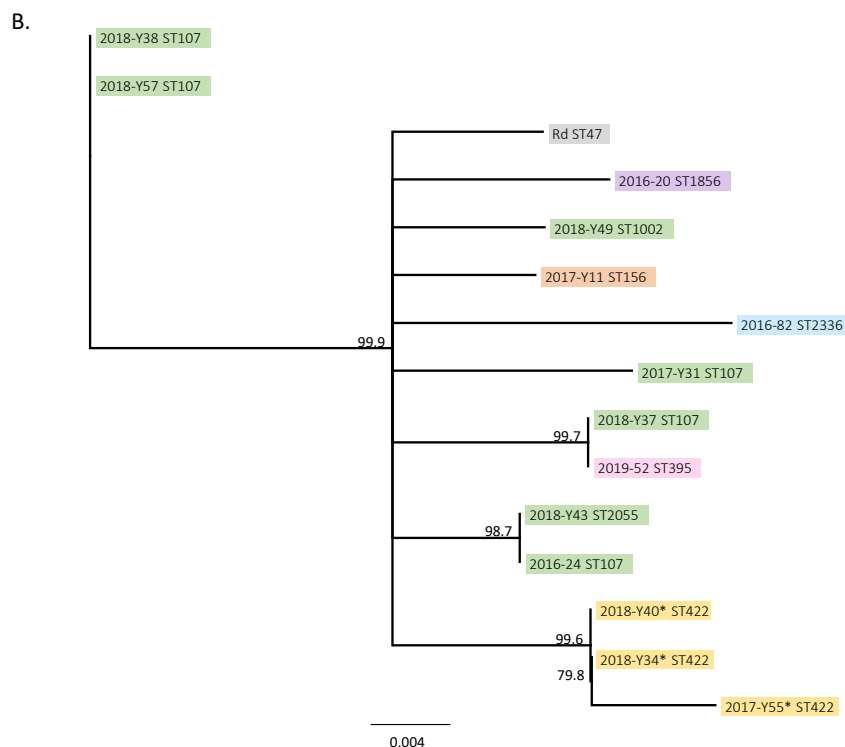


Figure 10. continued.

2. キノロン低感受性株の培養上清を用いた水平伝播実験

点変異によるキノロン低感受性化以外の要因を検討するために、標的遺伝子である *gyrA* と *parC* に変異を有する株の培養上清を用いて水平伝播実験を行った。供与菌として、キノロン標的遺伝子に変異を有する株の中から過去にゲノム上に *prophage* を保有する特徴を持つ 2018-Y40 株 (ST422) と、*H. influenzae* の中で主要なタイプである ST107 の 2018-Y38 を使用した^{38, 66, 83}。これらの培養上清の微粒子を PEG で沈殿濃縮したものを Rd 株と混合し、NA 含有培地で選択した。その結果、培養上清を混合した群の NA 耐性株数は、コントロールのそれよりも多く得られた (Figure 11A)。また、得られた NA 耐性株の *gyrA* は供与菌のものと組換わっていた (Figure 11B, C)。これらの株の LVX に対する MIC は 0.063 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで上昇していた (Table 4)。すなわち、得られた NA 耐性株は、*gyrA* が水平伝播したことによって生じたことが示された。

次いで、本培養上清中の水平伝播に寄与した具体的な因子について検討した。文献調査を行ったところ、候補物質として、*prophage*, *outer membrane vesicle*, 細胞外 DNA が考えられたため⁸⁵⁻⁸⁷、それぞれの要素を除外し同様の実験を行った。2018-Y40 株は、ゲノム上に 4 つの *prophage* 領域を保有するため⁸³、それぞれについての欠損株を作成し、欠損株の培養上清を調製した。*Outer membrane vesicle* については、

親株の培養上清中に 0.1% TritonX-100, 細胞外 DNA については, DNase I を添加することで, outer membrane vesicle と細胞外 DNA を含まない培養上清を調製した。これらの培養上清を用いて水平伝播実験を行ったところ, DNase I を添加した培養上清を用いたときのみ組換え株が得られなかった (Figure 11D)。このことから, この水平伝播には細胞外 DNA が関与していることが示唆された。培養上清中の 2 本鎖 DNA を Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量したところ, 定量限界 (2 ng/μL) 以下であったが, nested PCR を行うことで *gyrA* が検出された (Data not shown)。すなわち, 微量の DNA で水平伝播が起こることが示された。

Table 4. Antimicrobial susceptibility of representative recombinant strains

Strain	MIC (μg/mL)	
	Levofloxacin	Tosufloxacin
2018-Y40	0.5	2
2018-Y38	0.125	0.063
Rd	0.008	0.004
Rd _{2018-Y40} <i>gyrA</i>	0.063	0.032
Rd _{2018-Y38} <i>gyrA</i>	0.063	0.032
Rd _{2018-Y40} <i>gyrA</i> +2018-Y40 <i>parC</i>	0.25	0.5
Rd _{2018-Y38} <i>gyrA</i> +2018-Y40 <i>parC</i>	0.25	0.5

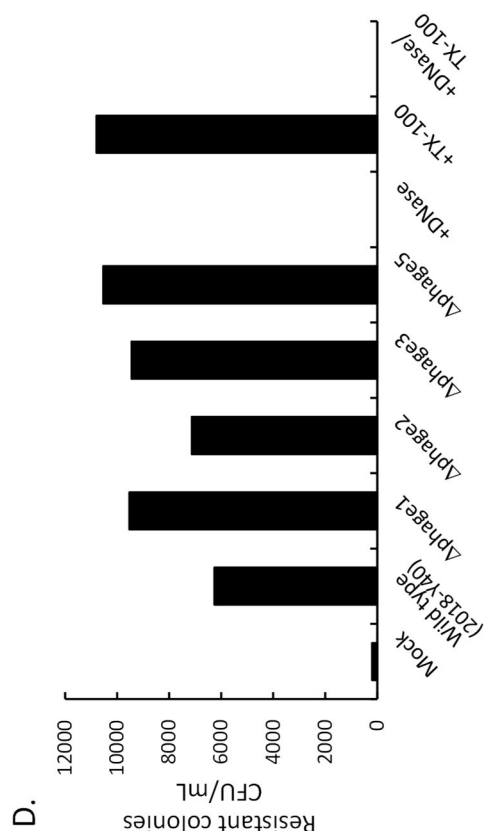


Figure 11. Horizontal gene transfer and sequence analyses.
 A. Representative result of supplemented brain heart infusion agar plates with 10 µg/mL of nalidixic acid following horizontal gene transfer assays. B, C. Sequence maps showing partial QRDRs of *gyrA* from recipient, donor (2018-Y40 or 2018-Y38), and recombinant strains. D. Bar graph indicating CFU/mL of resistant bacteria obtained following the horizontal gene transfer assays.

3. Uptake signal sequence の影響

前項で、キノロン耐性が細胞外 DNA を介して水平伝播することが示された。この伝播には、*H. influenzae* がもつ形質転換能が関与していると考えられた。形質転換には、DNA 上に存在する USS が関与することが知られている^{78,79,81,82})。 *gyrA* 上の USS を検索したところ、QRDR の下流、約 1,700 bp である 2,199-2,207 bp の領域に USS (5'-AAGTGC GGT-3') が存在していた。そこで、2018-Y40 株の *gyrA* を様々な長さで増幅・精製した fragment を作成し、培養上清の代わりに用いて水平伝播実験を行った (Figure 12A)。その結果、USS を含む断片を使用した場合に、有意に多くの NA 耐性株が得られた (Figure 12B)。加えて、耐性株の出現効率は USS の下流 50 bp 以上を含む断片を使用することで、有意に上昇していた。すなわち、受容菌が供与菌の *gyrA* の USS を認識し、遺伝子を取り込み、組換えが生じていることが示唆された。

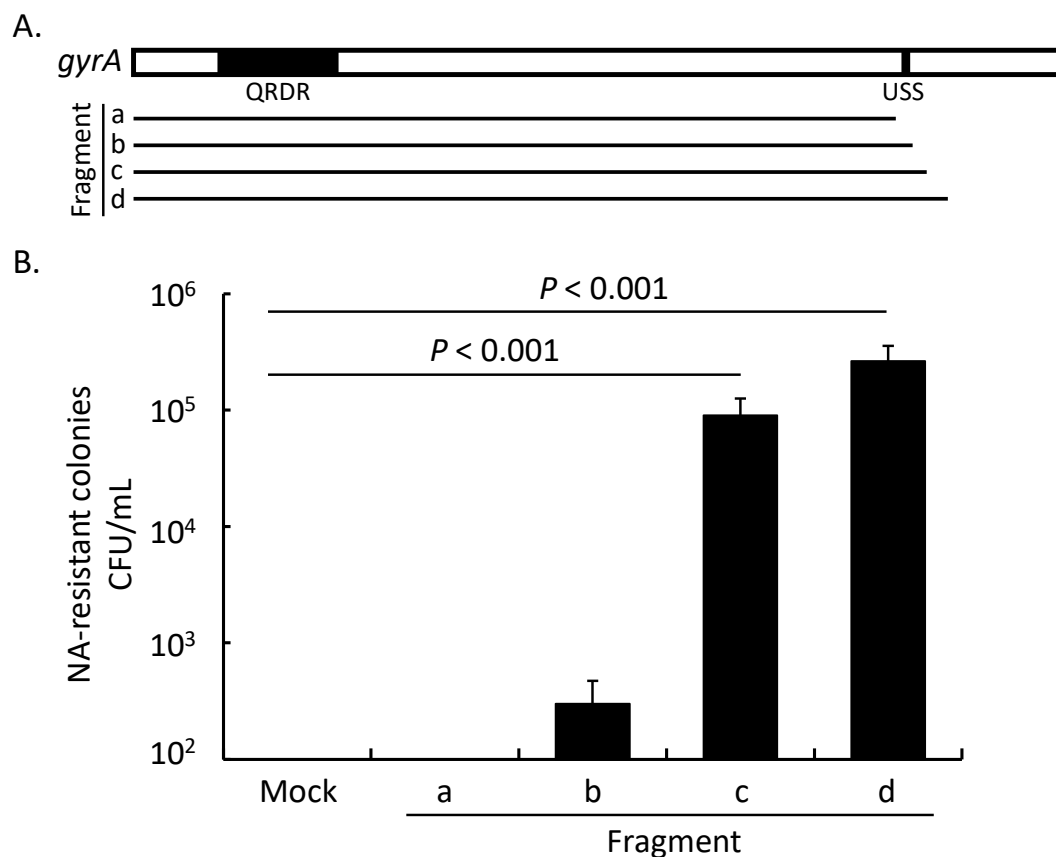


Figure 12. Role of the uptake signal sequence in horizontal transfer of *gyrA*.

A. Each fragment represents the PCR product of different length that was used for transfer assay. Fragment a does not contain USS, whereas b-d contain it. Fragment a, 2,169 bp; b, 2,217 bp; c, 2,258 bp; d, 2,318 bp. B. Bar graph indicating CFU/mL of NA-resistant colonies obtained from transfer assay. *P* value was calculated using one-way ANOVA test with Bonferroni correction.

USS, uptake signal sequence; QRDR, quinolone resistance-determining region. NA, nalidixic acid.

4. *parC* の水平伝播と USS の検討

gyrA の水平伝播が USS の認識を介して起こることが示唆されたため、キノロン耐性に関与する *parC* についても検討を行った。第 1 章の研究により、*gyrA* と *parC* の両方に変異を有する株は PPA で明確に選択できることが示されたため、*parC* の水平伝播実験では選択薬剤として PPA を使用した。

まず、本章第 1 節 - 【結果】 - 3 で使用した培養上清を *gyrA* の水平伝播実験と同様に Rd 株へ添加・培養後、PPA 培地で選択したところ、組換え株は得られなかった (Figure 13A)。一方、すでに Rd に 2018-Y40 株由来の *gyrA* を組換えた株 (Rd_{2018-Y40gyrA}) に上清を添加したところ、組換え株が得られた (Figure 13B)。ここで得られた株の *parC* 領域は 2018-Y40 株のものと組み換わっており、LVX の MIC も 0.25 µg/mL まで上昇し、親株と同レベルのキノロン低感受性を示した (Table 4)。すなわち、*parC* も水平伝播することが示された。

そこで、*parC* についても USS を検索したところ、既存の配列は存在しなかったが、1,340 bp 付近に USS と 1 塩基のみ異なる配列 (5'- AAGAGCGGT-3') が確認された (Figure 14A)。そこで、この領域を uptake signal-like sequence (USLS) とし、本章の結果 2 と同様に 2018-Y40 の *parC* を様々な長さになるように増幅し、Rd_{2018-Y40gyrA} に対する水平伝播実験を行った。その結果、1,250 bp 以上の fragment で組換え株が得られた (Figure 15)。さらに、組換え効率は 1,500 bp 以上の fragment で有意に上昇し、塩基配列の長さ依存的であった (Figure 14B)。1,258 bp の fragment d と 1,511 bp の fragment e の間には USLS が存在しており、USLS の認識が水平伝播に寄与することが示唆された。そこで、fragment の長さのみの影響を検討するために、*parC* の QRDR を含み USLS を含まない 1,265 bp と 1,520 bp の fragment を作成し実験を行った (Figure 16A, fragment A, B)。その結果、組換え株は得られなかった (Figure 16B)。すなわち、*parC* については、USLS の認識により、遺伝子の水平伝播が起こることが示唆された。

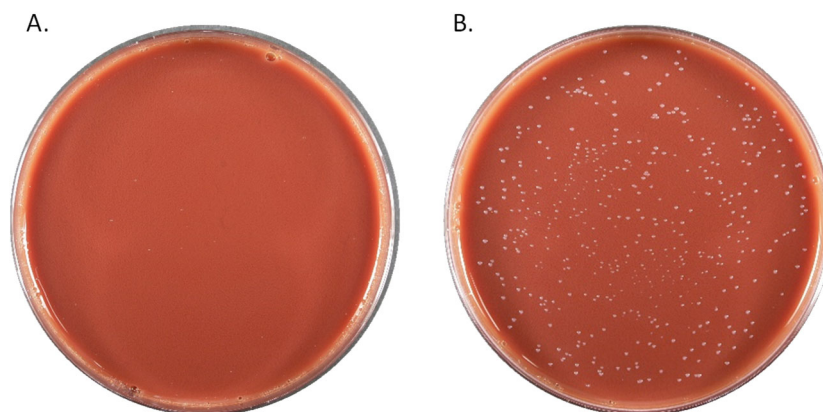


Figure 13. The chocolate agar plates supplemented with 30 µg/mL pipemidic acid after horizontal gene transfer experiments using 2018-Y40 supernatant. A and B indicate Rd and Rd_{2018-Y40gyrA}, respectively.

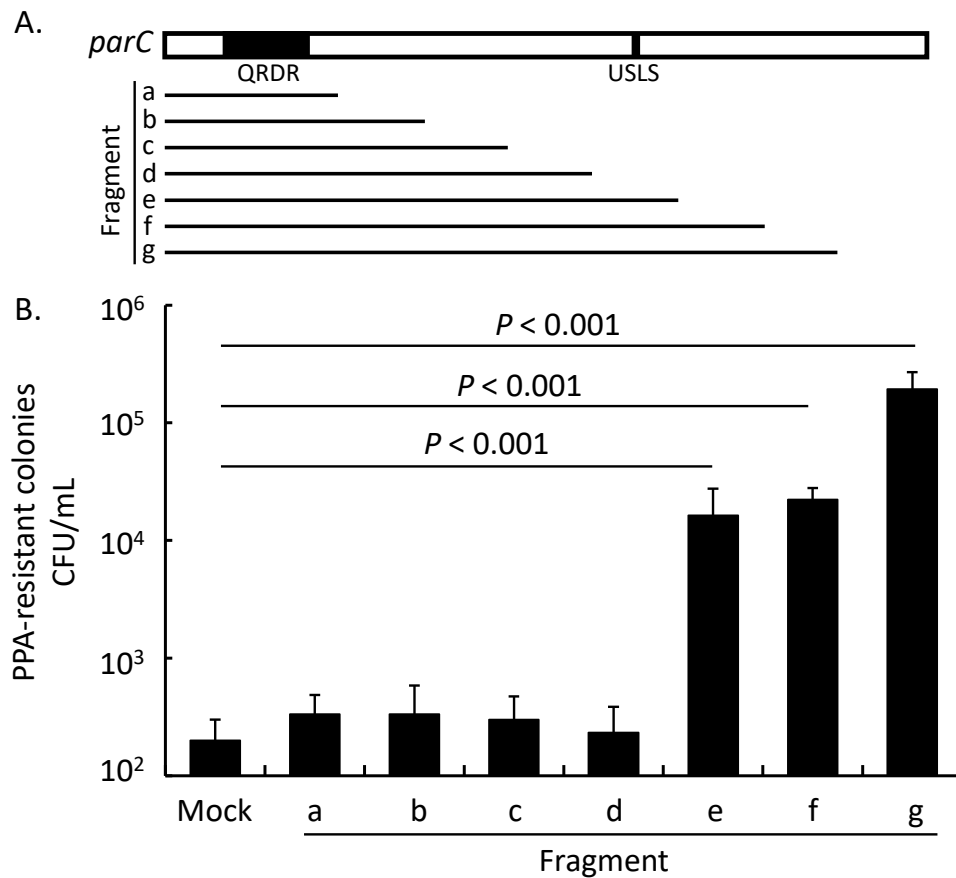


Figure 14. Role of the uptake signal-like sequence in horizontal transfer of *parC*.

A. Each fragment represents the PCR product of different length that was used for transfer assay. Fragment a-d do not contain USLS, whereas e-g contain it. Fragment a, 510 bp; b, 765 bp; c, 1,010 bp; d, 1,258 bp; e, 1,511 bp; f, 1,765 bp; g, 1,980 bp. B. Bar graph indicating CFU/mL of PPA-resistant colonies each resistant colonies obtained from transfer assay. *P* value was calculated using one-way ANOVA test with Bonferroni correction. USLS, uptake signal-like sequence; QRDR, quinolone resistance-determining region; PPA, pipemidic acid.

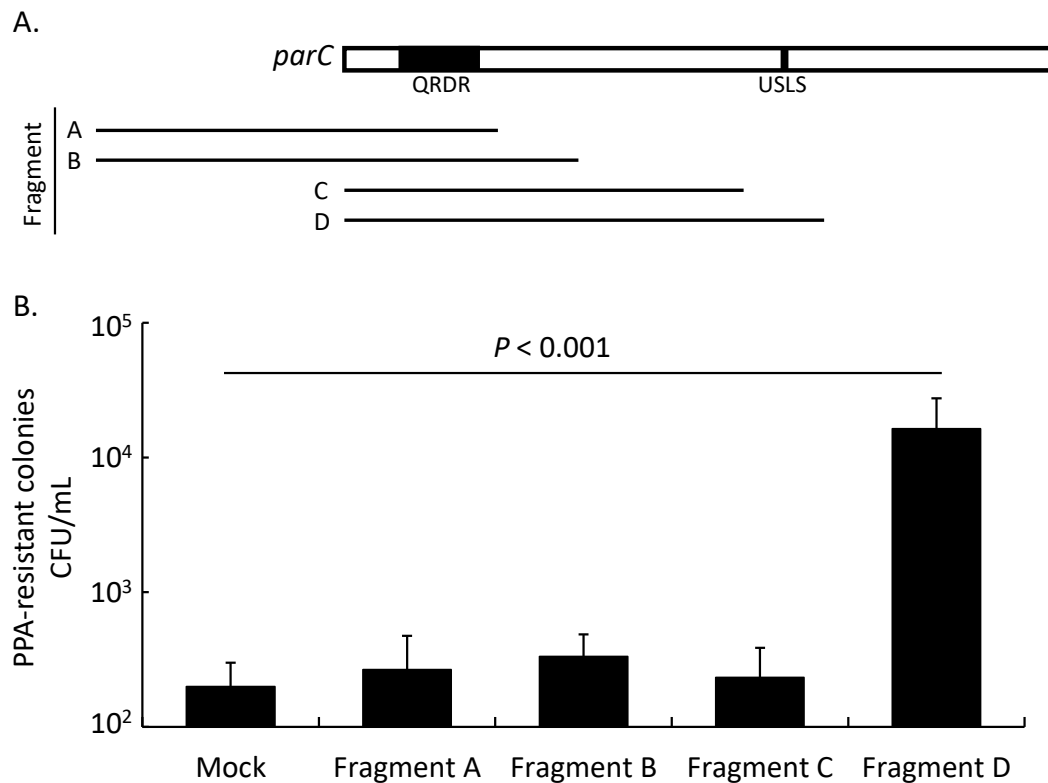


Figure 16. Evaluation of the recombination efficiency of *parC* fragments of varying lengths.

A. Each fragment represents the PCR product of different length that was used for transfer assay. A and B are shifted fragments that include QRDRs but USLS, whereas, C and D correspond to the sequences having same length and position in Figure 14. Fragment A, 1265 bp; B, 1520 bp; C, 1,258 bp; D, 1,511 bp. B. Bar graph indicating CFU/mL of PPA-resistant colonies each resistant colonies obtained from transfer assay. *P* value was calculated using one-way ANOVA test with Bonferroni correction.

USLS, uptake signal-like sequence; QRDR, quinolone resistance-determining region; PPA, piperimic acid.

5. 臨床分離株に対する水平伝播

これまでの実験で用いた Rd 株は実験室株であり、高い自然形質転換能を持つことが知られている⁷⁹⁾。実際に、臨床で分離される株において同様の現象が起こるか否かを確認するために、様々な遺伝学的背景を有する臨床分離 *H. influenzae* を用いて、同様の水平伝播実験を行った。Fragment は、*gyrA* の fragment d (Figure 12) と *parC* の fragment g (Figure 14) を用いた。その結果、耐性株出現の頻度にばらつきはあるものの、すべての株で NA 耐性株および PPA 耐性株がコントロールと比較し有意に多く得られた (Figure 17A, B)。すなわち、このようなキノロン耐性の水平伝播は、どのような *H. influenzae* 株に対しても起こり得ることが示された。

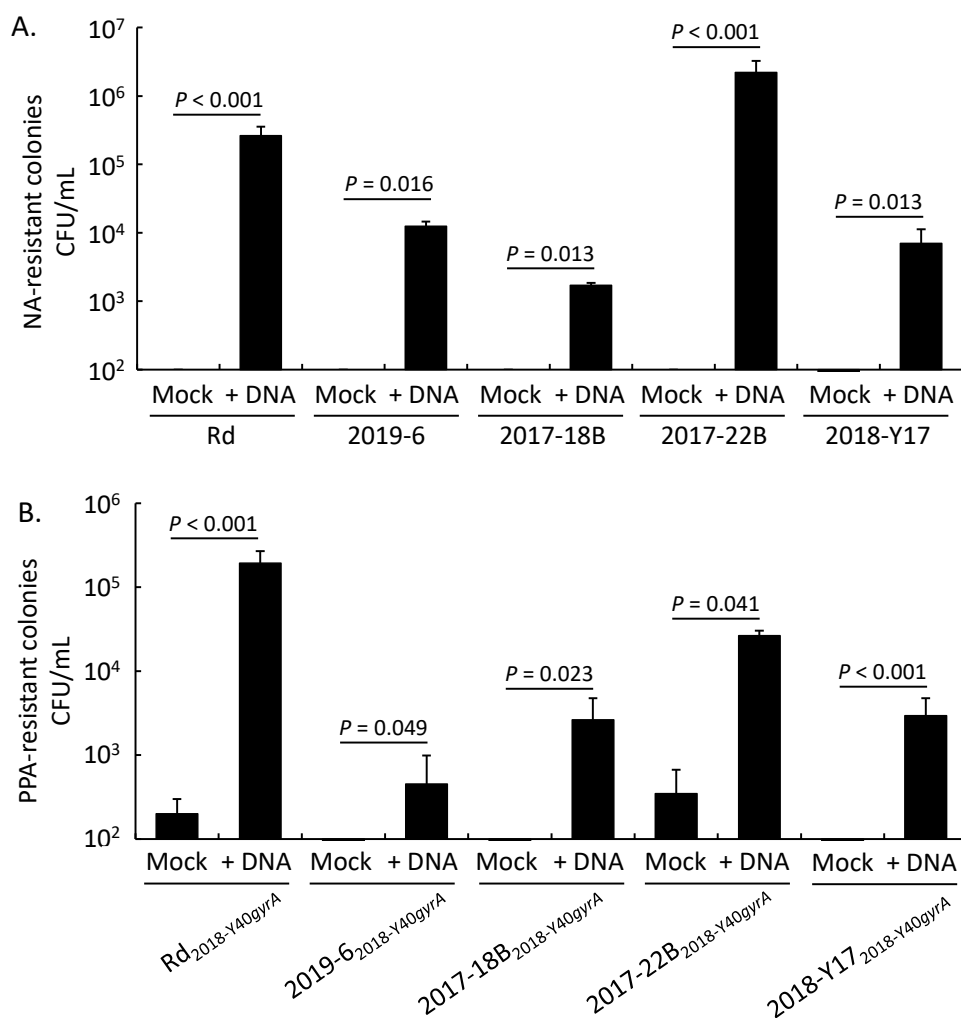


Figure 17. Horizontal transfer in clinical isolates.

A, B. Bar graph indicating CFU/mL of each resistant colonies obtained following the horizontal gene transfer assays using *H. influenzae* clinical strains. *P* value was calculated using Welch's *t* test.

NA, nalidixic acid; PPA, pipemidic acid.

第2節

複数遺伝子の同時水平伝播の検討

【 背景 】

本邦でアウトブレイクが発生した ST422 のキノロン低感受性 *H. influenzae* 株は、*gyrA* と *parC* の両方に変異を有していた^{49,56,57}。キノロンに対する低感受性化（耐性化）は段階的に進行すると考えられている（Figure 4）^{58,62,77}。しかしながら、アウトブレイク株の前段階である *gyrA* のみに変異を有する ST422 株は報告されていない。一方で、同地域では、*gyrA*、*parC* いずれにも変異を持たない株が認められている⁵⁷。このことは、*H. influenzae* が非段階的に低感受性化したことを示唆している。

本章第1節において、標的遺伝子の水平伝播がキノロン低感受性化に寄与することが示唆された。水平伝播であれば同時に遺伝子を取り込み、組換えが生じること一度に複数の領域を獲得し耐性化する可能性が考えられる。そのようなメカニズムが存在すれば、アウトブレイククローンについても出現要因の説明ができる。そこで、本節では、複数遺伝子の同時水平伝播について検証を行った。

【 材 料 ・ 方 法 】

1. 水平伝播実験

1-1. ゲノム DNA の抽出

ゲノム DNA は、2018-Y40 株より抽出した⁸³⁾。寒天培地上で培養した 2018-Y40 株のシングルコロニーを 3 mL の sBHI broth に接種し、一晚培養した。培養した菌を 10,000 × g で 2 min 遠心分離して集菌した。その後、Genomic DNA Purification Kit (Promega) を用いて、ゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA の濃度は、QuantiFluor ONE dsDNA System (Promega) あるいは Quantus Fluorometer (Promega) を用いて測定した。

1-2. 使用菌株

受容菌は、実験室株の Rd 株と、様々な遺伝学的背景を持つ臨床分離株 4 株 (2017-Y37, 2017-22B, 2018-Y17, 2019-6) を使用した。

1-3. 水平伝播実験

本章第 1 節 - 【材料・方法】 - 1 - 2 に記載した方法で行った。ゲノム DNA の添加量は、1, 10, 100, 1,000 ng とした。

1-4. ゲノム DNA コピー数の算出

ゲノム DNA のコピー数は、ThermoFisher Scientific の web tool (<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools.html>) を用いて、以下の式で算出した。

$$\text{Genomic DNA amount of 2018-Y40 (g)} / (1,957,393 \text{ bp} \times 660) \times 6.02 \times 10^{23}$$

2. キノロン標的遺伝子の解析

本章第 1 節 - 【材料・方法】 - 2 に記載した方法で行った。

3. 抗菌薬感受性試験

抗菌薬は、LVX、および TFX を使用した。抗菌薬感受性試験は、本章第 1 節 - 【材料・方法】 - 3 - 2 に記載した方法で行った。

4. ゲノム解析

Rd 株を受容菌とした水平伝播実験で発育したコロニーからランダムに選択し、ゲノム DNA を本章第 2 節 - 【材料・方法】 - 1 - 1 に記した方法で抽出した。抽出ゲノムのライブラリー調製と DNB Seq-G400 (MGI Tech Japan) を用いたシーケンス解析は、

Bioengineering Lab に依頼した。得られたシーケンスデータは、GENETYX NGS ver.9 (GENETYX) を用いて *H. influenzae* Rd 株 (accession no. L42023.1) と 2018-Y40 株 (accession no. AP022867.1) の配列を用いてマッピング解析を行った。解析に用いたデータは、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に BioProject PRJDB13949, BioSample SAMD00514953, 配列データ DRA014550 として登録した。

5. 統計解析

統計学的解析は、EZR を用いて Welch's *t* test により検定した。 $P < 0.05$ のとき統計学的に有意とした。

【 結 果 】

1. ゲノム DNA を用いた同時水平伝播の検証

変異をもつ *gyrA* と *parC* の両方が同時に伝播する可能性を検証するために、2018-Y40 株から抽出した様々な量のゲノム DNA を用いて、水平伝播実験を行った。その結果、使用したすべての株で NA 耐性株ならびに PPA 耐性株が得られた。耐性株の出現数は、添加したゲノム DNA の濃度依存的に増加していた (Figure 18)。NA 耐性株と PPA 耐性株をそれぞれランダムに選択し、キノロン標的遺伝子の配列を解析したところ、NA 耐性株は *gyrA* が、PPA 耐性株は *gyrA* と *parC* が 2018-Y40 のものと組み換わっていた。PPA 培地に得られた株の LVX の MIC は、2018-Y40 株と同等まで上昇していた (Table 5)。これらのことから、複数の変異をもった標的遺伝子が同時に水平伝播したことが明らかになった。

NA 耐性株と PPA 耐性株の出現数は、NA 耐性株の方が 10~1,000 倍多く、本章第 1 節で示した段階的な耐性化の方が *gyrA* と *parC* に変異を有する株の出現は起こりやすいことが示された。また、受容菌株ごとに水平伝播による耐性菌の出現数にはバラツキがあり、組換えに必要な DNA 量は株によって様々であった。最も効率の良かった 2017-22B 株 (ST143) では、 4.5×10^5 copy のゲノム DNA により、*gyrA* と *parC* の同時組換えが起こっていた。

Table 5. Quinolone susceptibility of horizontally transferred *H. influenzae*

Strain	ST	Selected agent	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
			Levofloxacin	Tosufloxacin
2018-Y40	422	-	0.5	2
		-	0.008	0.004
Rd	47	NA	0.063	0.063
		PPA	0.5	0.5
2018-Y17	107	-	0.016	0.008
		NA	0.125	0.125
2017-22B	143	PPA	0.5	1
		-	0.008	0.008
2017-Y37	155	NA	0.063	0.063
		PPA	0.5	1
2019-6	422	-	0.008	0.004
		NA	0.125	0.125
		PPA	0.5	1

NA, nalidixic acid; PPA, pipemidic acid; -, parent strain

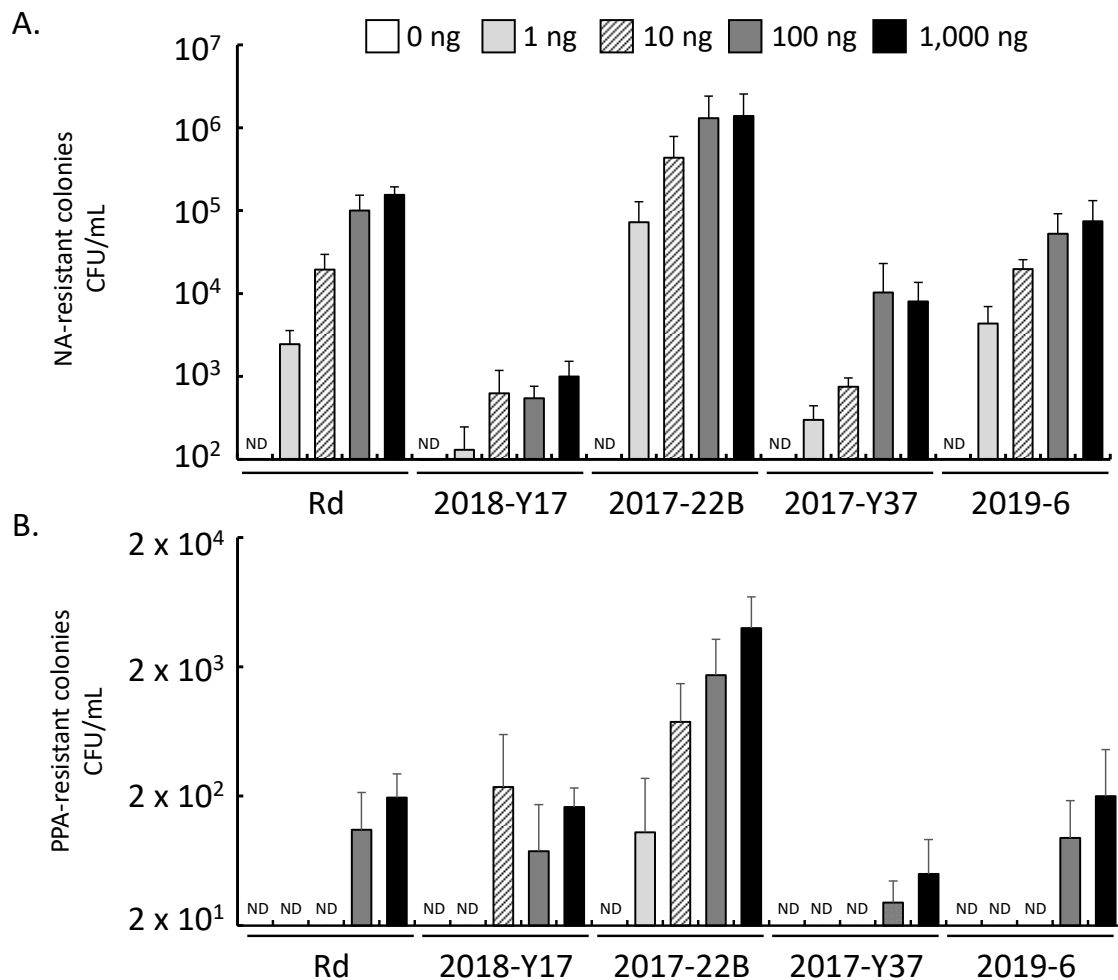


Figure 18. Horizontal gene transfer with varying concentrations of genomic DNA. The bar graph indicates CFU/mL of resistant bacteria obtained by horizontal gene transfer assays. Resistant colonies of A and B were selected using nalidixic acid (10 μ g/mL) and pipemidic acid (30 μ g/mL), respectively. ND, not detected; NA, nalidixic acid; PPA, pipemidic acid.

2. ゲノム解析

ゲノム DNA を用いた水平伝播実験で得られた同時水平伝播株のゲノム構造を明らかにするために、全ゲノム配列解析を行った。その結果、短い組換えがゲノム全体で多数認められた。さらに、10 kbp 以上の大きな組換えが 3 か所で認められた (Figure 19A)。 *gyrA* とその周辺領域を詳細に解析したところ、 *gyrA* の QRDR を含む 2.6 kbp が 2018 - Y40 株のものと組み換わっていた (Figure 19B)。また、 *parC* 周辺領域は、 *parC* の全領域を含む 22 kbp の組換えが認められた (Figure 19C)。すなわち、 *H. influenzae* は、菌体外のゲノム DNA を取り込み、複数の遺伝子が組み換わる機構があることが示された。

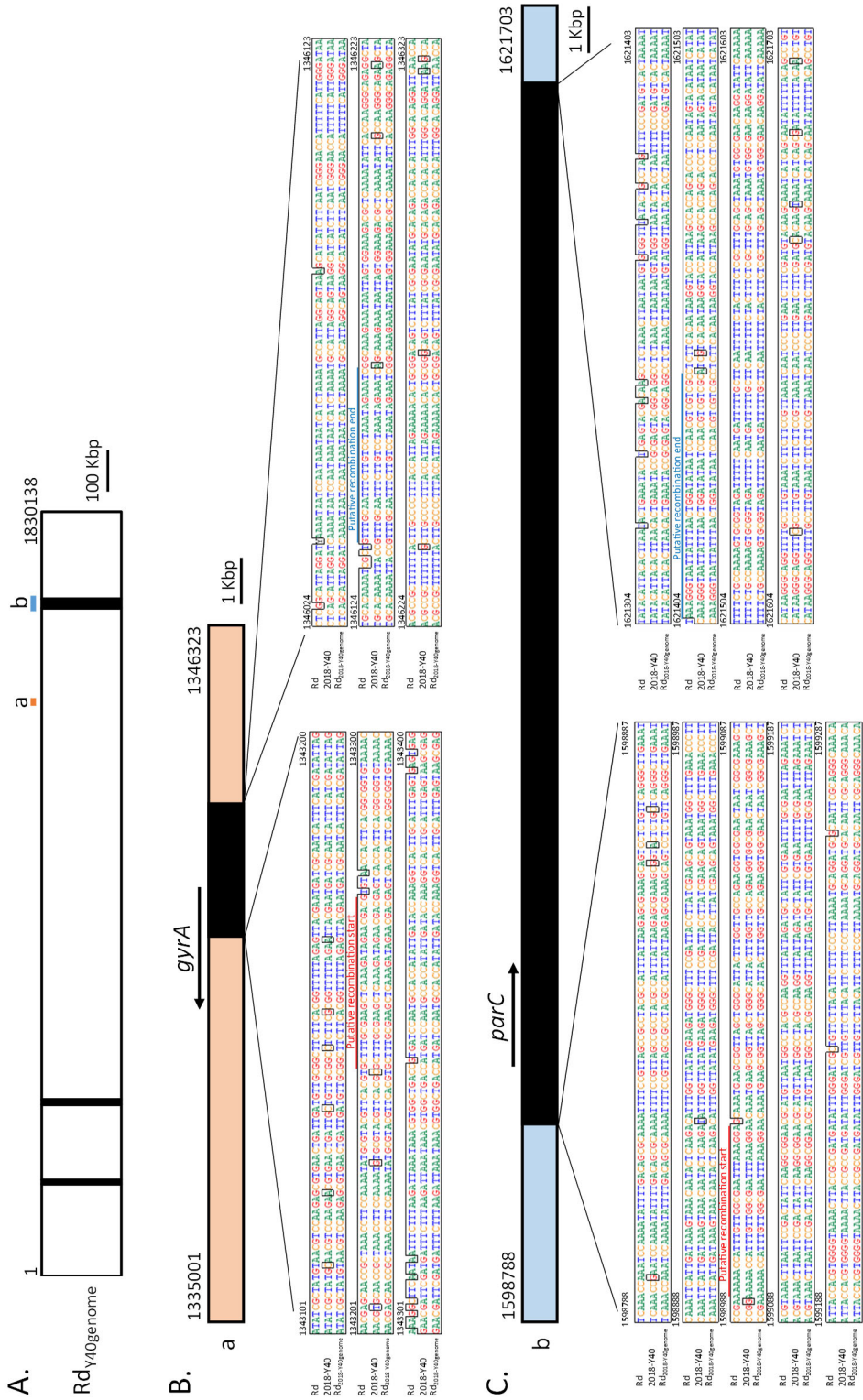


Figure 19. Genome structure of representative recombinant strain Rd2018-Y40.

A. Whole-genome structure of a representative recombinant strain Rd2018-Y40. The black regions indicate >10 kb regions identical to the sequence of 2018-Y40. B, C. Enlarged views of regions 'a' and 'b' in A. These regions include the quinolone-targeting genes *gyrA* B and *parC* C and their flanking regions. The black regions are identical to the sequence of 2018-Y40. Sequence alignments indicate the start, end, and end of recombination. These alignments were generated using ClustalW.

【 考 察 】

H. influenzae のキノロン低感受性化は、薬物の標的遺伝子の *gyrA* および *parC* の QRDR の点変異に起因すると考えられている。実際、臨床で分離されるキノロン低感受性株や耐性株の標的遺伝子には、耐性に関与する変異が認められている^{38, 58, 60}。一方で、点変異の頻度は必ずしも高くないため、近年の低感受性株の増加が点変異のみで起こるとは考えにくい。しかし、その他の出現メカニズムについては明らかになっていなかった。

第 1 節で得られた知見から、*H. influenzae* が細胞外 DNA を取り込み、キノロン低感受性株のキノロン標的遺伝子と組換えることで低感受性化することが明らかとなった。培養上清中の 2 本鎖 DNA 量は定量限界以下であり、nested PCR で検出できる程度の量であったが、わずかな DNA でも水平伝播が起こりうることを示された。また、PCR で増幅させた *gyrA* と *parC* の fragment を用いた実験により、キノロン標的遺伝子上に存在する USS (5'-AAGTGCGGT-3') や USLS (5'-AAGAGCGGT-3') の認識が、水平伝播に重要であることが実験的に証明された。USS は 9 塩基のうち、特に 5'-GCGG-3' の 4 塩基が認識に重要であることが報告されている⁸⁸。既知の USS と 1 塩基異なる *parC* 上の USLS が USS のように機能したことは、このコアとなる 4 塩基が保存されていたためと考えられる。一般的に、グラム陰性菌は *gyrA* に次いで *parC* という順で段階的に変異が入り、キノロン耐性化することが知られている^{58, 62, 77}。これまで、*parC* のみに変異をもつ低感受性株は臨床でも分離されておらず、実験的にも出現していない。本研究の結果から、*parC* 自体の組換え効率は *gyrA* と同程度であるため、組換え自体は起こっていると考えられる。しかし、仮に *parC* の組換えが起きて、*parC* 単独の組換えではキノロン系薬の MIC 値に影響するような変化が起こらないことが予測される。最近、*Escherichia coli* において、キノロン耐性化に対する DNA gyrase への変異と topoisomerase IV への変異や薬剤排出ポンプの亢進の役割について検証した報告がなされた⁸⁹。この報告では、グラム陰性菌にとって *gyrA* への変異はキノロン耐性化への起点となり、*parC* の変異は耐性度の上昇に影響するとされている。本研究においても、*gyrA* に変異をもつ株は容易に変異を有する *parC* を獲得し、更に耐性化する可能性があることが実験的に示された。

第 2 節の低感受性株由来のゲノム DNA を用いた水平伝播実験より、複数の標的遺伝子が同時に伝播することが示された。これまで、キノロン耐性化は、上述したように段階的に進行することが定説であると考えられてきた。しかし、*H. influenzae* の場合、本菌のもつ自然形質転換能により、非段階的に耐性化する仕組みが本章の結果から初めて明らかとなった。また、ゲノム DNA を用いた実験で出現した PPA 耐性株は、親株とゲノム全体で多数の小さい組換えと 10 kb 以上の大きい 3 か所の組換えを起こしていた。このことは、*H. influenzae* では、キノロン耐性の伝播のみならず、ゲノムの大規模な再編成が容易に起こりうることを示している。すなわち、このよ

うな機構をもつ *H. influenzae* は、進化速度が非常に速い可能性が考えられた。

さらに、本章の結果から、臨床分離株を受容菌とした場合、耐性株の出現頻度は多様であり、“耐性化しやすい株”や“耐性化しにくい株”が存在することが示された。特に、2017-22B 株のように非常に高い組換え能を有する株が認められた。このような株は、現時点では感受性であっても潜在的に薬剤耐性化しやすい能力をもつ“潜在的耐性株”である可能性が示された。自然形質転換には細胞外 DNA の認識、菌体内への取り込み、自身の染色体との組換えの 3 つが重要である⁸⁰⁾。そのため、このいずれかもしくは複数の能力に差があると考えられる。このような株を早期に検出する仕組みの構築についても、今後の検討課題になると考える。

本章の結果から、キノロン低感受性 *H. influenzae* は、変異を有した標的遺伝子を細胞外から取り込んで出現することが明らかになった。さらに、*H. influenzae* は、一度に複数の遺伝子が組換わり、非段階的にキノロン系薬に低感受性化する新しいメカニズムを有することが明らかになった。

【 総 括 】

薬剤耐性 (antimicrobial resistance, AMR) は世界的に深刻な問題となっており、各国で様々な対策が実施されている。特に、抗菌スペクトルが広いキノロン系薬の不適切な使用は、病原菌のみならず常在菌などの薬剤耐性化を招くことが危惧されている。本研究では、近年、日本で増加が報告されていることに加え、キノロン系薬による治療に抵抗性を示すにも関わらず、通常の検査で「感受性」と判定されるキノロン低感受性 *H. influenzae* に着目し、簡易検出法の開発ならびに低感受性化機構について解析した。

第1章では、オールドキノロン系薬を使用したキノロン低感受性 *H. influenzae* の簡易検出法の開発を行った。その結果、NA ディスクを用いて阻止円の消失を評価することで、キノロン低感受性株を高精度、簡便かつ安価に検出できることを明らかにした。さらに、PPA ディスクを用いた試験を併用することで、*parC* 変異の有無を推定できることを示した。

第2章では、キノロン低感受性株の出現機構について解析し、第1節では、従来、水平伝播しないと考えられていたキノロン耐性について、*H. influenzae* がわずかな細胞外 DNA を取り込み、自身の遺伝子と組換えを起こすことで水平伝播することを見出した。また、この水平伝播が USS や USLS の認識を介して起こることを示した。第2節では、複数のキノロン標的遺伝子が同時に水平伝播し、これまで段階的に進行するとされていたキノロン低感受性化が、非段階的に発生する新しいメカニズムを明らかにした。加えて、水平伝播で得られたキノロン低感受性株は、ゲノム全体で多くの組換えが起こっていることを示した。

AMR の拡大は、広域スペクトルを有する経口セフェム系薬、マクロライド系薬、キノロン系薬の不適切な使用が影響したと考えられている⁹⁰⁾。特に、小児領域において使用できる抗菌薬には限りがあり、耐性菌の出現を抑えることは重大な課題である。キノロン系薬は、小児に対しては耐性菌による感染症に限定的に使用するとされている。しかし、日本の3,000施設以上の医療機関を対象とした調査によると、54%の医師が小児にキノロン系薬を処方した経験があると答えており、耐性菌が原因と同定されていない場合でも経験的に使用されている現状がある⁴⁷⁾。昨今の小児感染症の起炎菌におけるキノロン系薬以外の抗菌薬に対する耐性化状況も改善しているとはいえず、キノロン系薬の使用量は依然として低下しないことが予想される。そのため、適応進化能力の高い *H. influenzae* などにおいては、現時点では低感受性であっても、さらに高度なキノロン耐性株の出現が懸念される。本研究で開発したディスク法による簡易検出法は、キノロン低感受性 *H. influenzae* の早期での検出や抗菌薬の適正使用に寄与することが期待される。また、水平伝播による新たなキノロン耐性機構の解明は、薬剤耐性菌の出現と伝播を防ぐための新規薬剤のターゲットを提示することに大きく寄与すると考えられる。

【 謝 辞 】

本研究の遂行にあたり、多くのご助言とご協力を賜るとともに、日頃より御力添えを賜りました、東京薬科大学薬学部 臨床微生物学教室 中南 秀将 教授に深く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行ならびに論文を作成するにあたり、終始熱心なご指導、ご助言を賜るとともに、学部学生時より研究を志す機会を与え、日頃から多大な御力添えを賜りました、名城大学薬学部 微生物学研究室 輪島 丈明 准教授に心より厚く深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、多くのご助言とご協力を賜るとともに、日頃より御力添えを賜りました、名城大学薬学部 微生物学研究室 打矢 恵一 教授に深く御礼申し上げます。

さらに、本研究を行う機会を与えていただき、学部学生時より、懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました、東京薬科大学 野口 雅久 名誉教授に深く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、ご協力していただきました、東京薬科大学薬学部 臨床微生物学教室 中瀬 恵亮 講師、吉田 拓真 助手、河名 ますみ 氏に心より感謝いたします。

また、本学位論文の審査に関して、副査の労を賜りました東京薬科大学 薬学部 田野中 浩一 教授、安達 禎之 教授に深く御礼申し上げます。

国立研究開発法人 科学技術支援機構 次世代研究者挑戦的研究プログラムにて、メンターとして多大なご協力、ご助言を賜りました東京薬科大学生命科学部 渡邊 一哉 教授に深く御礼申し上げます。また、同プログラムにおいてオポーンメントとして本学位論文に関してご助言を賜りました東京薬科大学薬学部 根岸 洋一 教授、高柳 理早 准教授に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、学部学生時より、様々な面でご指導、ご助言を賜りました、慶應義塾大学病院 感染制御部 瀬山 翔史 博士に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、共に研究に励み、多くのご協力をいただきました、東京薬科大学薬学部 臨床微生物学教室の皆様ならびに、名城大学薬学部 微生物学研究室の皆様にも深く御礼申し上げます。

本研究は、公益財団法人 日本科学協会 笹川科学研究助成の支援を受けたものであり、研究遂行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。

また、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ならびに、国立研究開発法人 科学技術支援機構 次世代研究者挑戦的研究プログラムには、大学院での研究生活における経済的支援を賜りました。本事業に心より感謝申し上げます。

最後に、日頃から温かく応援して下さった家族、友人に心より感謝いたします。

【 引用文献 】

- 1) Kilian M. *Genus III. Haemophilus Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith.* (2005).
- 2) Norskov-Lauritsen N: Classification, identification, and clinical significance of *Haemophilus* and *Aggregatibacter* species with host specificity for humans. *Clin Microbiol Rev*, **27**, 214-240 (2014).
- 3) Schadewaldt H: First description of *Haemophilus influenzae* by Richard Pfeiffer. *Dtsch Med Wochenschr*, **100**, 2405-2408 (1975).
- 4) Wouters I, Desmet S, Van Heirstraeten L, Herzog SA, Beutels P, Verhaegen J, Goossens H, Van Damme P, Malhotra-Kumar S, Theeten H, NPcarriage Study Group: How nasopharyngeal pneumococcal carriage evolved during and after a PCV13-to-PCV10 vaccination programme switch in Belgium, 2016 to 2018. *Euro Surveill*, **25**, 32-44 (2020).
- 5) Patrick R. Murray EJB, James H. Jorgensen, Marie Louise Landry, and Michael A.: *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition. **1**, (2008).
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) 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).
- 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) Kelly T, Dillard JP, Yother J: Effect of genetic switching of capsular type on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, **62**, 1813-1819 (1994).
- 11) 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).

- 12) 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).
- 13) 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).
- 14) 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).
- 15) Griffith F: The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)*, **27**, 113-159 (1928).
- 16) Takala AK, van Alphen L, Musser JM, Geelen L, Selander RK, Eskola J, Makela PH: Bacteriologic epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b strains causing invasive infections in Finland. *J Infect Dis*, **160**, 237-242 (1989).
- 17) 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).
- 18) 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).
- 19) Bender JM, Cox CM, Mottice S, She RC, Korgenski K, Daly JA, Pavia AT: Invasive *Haemophilus influenzae* disease in Utah children: an 11-year population-based study in the era of conjugate vaccine. *Clin Infect Dis*, **50**, e41-46 (2010).
- 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) Suga S, Ishiwada N, Sasaki Y, Akeda H, Nishi J, Okada K, Fujieda M, Oda M, Asada K, Nakano T, Saitoh A, Hosoya M, Togashi T, Matsuoka M, Kimura K, Shibayama K: A nationwide population-based surveillance of invasive *Haemophilus influenzae* diseases in children after the introduction of the *Haemophilus influenzae* type b vaccine in Japan. *Vaccine*, **36**, 5678-5684 (2018).

- 22) 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).
- 23) 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).
- 24) 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).
- 25) Whittaker R, Economopoulou A, Dias JG, Bancroft E, Ramliden M, Celentano LP, European Centre for Disease P: Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* disease, Europe, 2007-2014. *Emerg Infect Dis*, **23**, 396-404 (2017).
- 26) Ubukata K, Morozumi M, Sakuma M, Adachi Y, Mokuno E, Tajima T, Iwata S, Group AOMSS: Genetic characteristics and antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with acute otitis media after introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in Japan. *J Infect Chemother*, **25**, 720-726 (2019).
- 27) 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).
- 28) 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).
- 29) 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).
- 30) Mikasa K, Aoki N, Aoki Y, Abe S, Iwata S, Ouchi K, Kasahara K, Kadota J, Kishida N, Kobayashi O, Sakata H, Seki M, Tsukada H, Tokue Y, Nakamura-Uchiyama F, Higa F, Maeda K, Yanagihara K, Yoshida K: JAID/JSC Guidelines for the Treatment of Respiratory Infectious Diseases: The Japanese Association for Infectious Diseases/Japanese Society of Chemotherapy - The JAID/JSC Guide to Clinical Management of Infectious Disease/Guideline-preparing Committee Respiratory Infectious Disease WG. *J Infect Chemother*, **22**, S1-S65 (2016).

- 31) 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).
- 32) Flournoy DJ: *In vitro* susceptibilities of *Haemophilus influenzae* isolates from a veterans administration medical center. *Med Microbiol Immunol*, **173**, 303-309 (1985).
- 33) Gutmann L, Williamson R, Collatz E, Acar JF: Mechanisms of beta-lactam resistance in *Haemophilus influenzae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **7**, 610-615 (1988).
- 34) 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).
- 35) 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).
- 36) 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).
- 37) 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).
- 38) Tanaka E, Hara N, Wajima T, Ochiai S, Seyama S, Shirai A, Shibata M, Shiro H, Natsume Y, Noguchi N: Emergence of *Haemophilus influenzae* with low susceptibility to quinolones and persistence in tosufloxacin treatment. *J Glob Antimicrob Resist*, **18**, 104-108 (2019).
- 39) Yamada S, Seyama S, Wajima T, Yuzawa Y, Saito M, Tanaka E, Noguchi N: beta-Lactamase-non-producing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* is acquiring multidrug resistance. *J Infect Public Health*, (2019).
- 40) 長谷川恵子, 千葉菜穂子, 小林玲子, 諸角美由紀, 岩田敏, 砂川慶介, 生方公子, 化膿性髄膜炎・全国サーベイランス研究班: 化膿性髄膜炎例から分離された *Haemophilus influenzae* の疫学解析-1999年から2003年の分離株について-感染症学雑誌, **78**, 835-845 (2004).

- 41) Hasegawa K, Kobayashi R, Takada E, Ono A, Chiba N, Morozumi M, Iwata S, Sunakawa K, Ubukata K, Nationwide Surveillance for Bacterial M: 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).
- 42) Ubukata K, Chiba N, Morozumi M, Iwata S, Sunakawa K, Working Group of Nationwide Surveillance for Bacterial M: Longitudinal surveillance of *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with meningitis throughout Japan, 2000-2011. *J Infect Chemother*, **19**, 34-41 (2013).
- 43) Pakyz AL, Oinonen M, Polk RE: Relationship of carbapenem restriction in 22 university teaching hospitals to carbapenem use and carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, **53**, 1983-1986 (2009).
- 44) White AC, Jr., Atmar RL, Wilson J, Cate TR, Stager CE, Greenberg SB: Effects of requiring prior authorization for selected antimicrobials: expenditures, susceptibilities, and clinical outcomes. *Clin Infect Dis*, **25**, 230-239 (1997).
- 45) Blondeau JM, DeCarolis E, Metzler KL, Hansen GT: The macrolides. *Expert Opin Investig Drugs*, **11**, 189-215 (2002).
- 46) Seyama S, Wajima T, Nakaminami H, Noguchi N: Clarithromycin resistance mechanisms of epidemic beta-lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*, **60**, 3207-3210 (2016).
- 47) 日本化学療法学会 日, 日本小児感染症学会, 小児用キノロン系適正使用推進委員会: 小児に対するキノロン薬の使用状況に関するアンケート調査成績. *日本化学療法学会雑誌*, **66**, 551-557 (2018).
- 48) 第一三共株式会社: クラビット®錠添付文書, 第1版 (2020).
- 49) Takeuchi N, Ohkusu M, Hoshino T, Yamamoto S, Segawa S, Murata S, Ishiwada N: Emergence of *Haemophilus influenzae* with low susceptibility to quinolones isolated from pediatric patients in Japan. *J Infect Chemother*, (2021).
- 50) Tateda K, Ohno A, Ishii Y, Murakami H, Yamaguchi K, Levofloxacin surveillance g: Investigation of the susceptibility trends in Japan to fluoroquinolones and other antimicrobial agents in a nationwide collection of clinical isolates: A longitudinal analysis from 1994 to 2016. *J Infect Chemother*, **25**, 594-604 (2019).
- 51) 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).

- 52) Tanaka T, Oishi T, Miyata I, Wakabayashi S, Kono M, Ono S, Kato A, Fukuda Y, Saito A, Kondo E, Teranishi H, Tanaka Y, Wakabayashi T, Akaike H, Ogita S, Ohno N, Nakano T, Terada K, Ouchi K: Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection, Japan, 2008-2015. *Emerg Infect Dis*, **23**, 1703-1706 (2017).
- 53) Baek JY, Kang CI, Kim SH, Ko KS, Chung DR, Peck KR, Lee NY, Song JH: Emergence of multidrug-resistant clones in levofloxacin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **91**, 287-290 (2018).
- 54) Pletz MW, Fugit RV, McGee L, Glasheen JJ, Keller DL, Welte T, Klugman KP: Fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Emerg Infect Dis*, **12**, 1462-1463 (2006).
- 55) Takeuchi N, Ohkusu M, Hoshino T, Naito S, Takaya A, Yamamoto T, Ishiwada N: Emergence of quinolone-resistant strains in *Streptococcus pneumoniae* isolated from paediatric patients since the approval of oral fluoroquinolones in Japan. *J Infect Chemother*, **23**, 218-223 (2017).
- 56) Tanaka E, Wajima T, Hara N, Shirai A, Shibata M, Shiro H, Noguchi N: First outbreak of *Haemophilus influenzae* clone ST422 with low susceptibility to quinolones in paediatric patients in Japan. *J Med Microbiol*, **69**, 239-243 (2020).
- 57) Tanaka E, Wajima T, Hirai Y, Nakaminami H, Noguchi N: Dissemination of quinolone low-susceptible *Haemophilus influenzae* ST422 in Tokyo, Japan. *J Infect Chemother*, (2021).
- 58) 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).
- 59) Hooper DC: Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat*, **2**, 38-55 (1999).
- 60) 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).
- 61) Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC: Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Microbiol Rev*, **20**, 368-389 (2007).
- 62) 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).
- 63) CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th ed. CLSI, Wayne, PA (2019).

- 64) 富士フィルム富山化学株式会社: オゼックス®細粒小児用 15% 医薬品インタビューフォーム. (2020).
- 65) Mizoi K, Wajima T, Tanaka E, Nakaminami H, Noguchi N: Comparison of the bactericidal effects of quinolones against low-susceptible *Haemophilus influenzae*. *J Med Microbiol*, **70**, (2021).
- 66) Hara NW, T.; Tanaka, E.; Noguchi, N.; Shirai, A.; Shibata, M.; Shiro, M.: Two cases in which tosufloxacin was administered for respiratory infections that may have been caused by *Haemophilus influenzae* less susceptible to quinolone. *Jpn J Pharm Health Care Sci*, **46**, 3 (2020).
- 67) 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).
- 68) Idelevich EA, Becker K: How to accelerate antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect*, **25**, 1347-1355 (2019).
- 69) 満山順一: キノロン系抗菌薬の基礎. *日本薬理学雑誌*, **130**, 287-293 (2007).
- 70) Hirai K: History of mode of action and resistance mechanisms of quinolones. *Jpn. J. Chemother.*, **53**, 349-356 (2005).
- 71) Shimizu M, Takase Y, Nakamura S, Katae H, Minami A: Pipemidic acid, a new antibacterial agent active against *Pseudomonas aeruginosa*: in vitro properties. *Antimicrob Agents Chemother*, **8**, 132-138 (1975).
- 72) Newsom SW: The antimicrobial spectrum of norfloxacin. *J Antimicrob Chemother*, **13 Suppl B**, 25-31 (1984).
- 73) Giufre M, Fabiani M, Cardines R, Riccardo F, Caporali MG, D'Ancona F, Pezzotti P, Cerquetti M: Increasing trend in invasive non-typeable *Haemophilus influenzae* disease and molecular characterization of the isolates, Italy, 2012-2016. *Vaccine*, **36**, 6615-6622 (2018).
- 74) Jorgensen JH, Ferraro MJ: Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*, **49**, 1749-1755 (2009).
- 75) Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*, **48**, 452-458 (2013).
- 76) Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF: Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, **148**, 1667-1686 (1998).
- 77) Li X, Mariano N, Rahal JJ, Urban CM, Drlica K: Quinolone-resistant *Haemophilus influenzae*: determination of mutant selection window for ciprofloxacin, garenoxacin, levofloxacin, and moxifloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 4460-4462 (2004).
- 78) Maughan H, Redfield RJ: Tracing the evolution of competence in *Haemophilus influenzae*. *PLoS One*, **4**, e5854 (2009).

- 79) Maughan H, Redfield RJ: Extensive variation in natural competence in *Haemophilus influenzae*. *Evolution*, **63**, 1852-1866 (2009).
- 80) Mell JC, Shumilina S, Hall IM, Redfield RJ: Transformation of natural genetic variation into *Haemophilus influenzae* genomes. *PLoS Pathog*, **7**, e1002151 (2011).
- 81) Goodgal SH, Mitchell MA: Sequence and uptake specificity of cloned sonicated fragments of *Haemophilus influenzae* DNA. *J Bacteriol*, **172**, 5924-5928 (1990).
- 82) Sisco KL, Smith HO: Sequence-specific DNA uptake in *Haemophilus* transformation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 972-976 (1979).
- 83) Tanaka E, Wajima T, Nakaminami H, Noguchi N: Whole-genome sequence of *Haemophilus influenzae* ST422 outbreak clone strain 2018-Y40 with low quinolone susceptibility isolated from a paediatric patient. *J Glob Antimicrob Resist*, **22**, 759-761 (2020).
- 84) Harrison A, Dyer DW, Gillaspay A, Ray WC, Mungur R, Carson MB, Zhong H, Gipson J, Gipson M, Johnson LS, Lewis L, Bakaletz LO, Munson RS, Jr.: Genomic sequence of an otitis media isolate of nontypeable *Haemophilus influenzae*: comparative study with *H. influenzae* serotype d, strain KW20. *J Bacteriol*, **187**, 4627-4636 (2005).
- 85) Muschiol S, Balaban M, Normark S, Henriques-Normark B: Uptake of extracellular DNA: competence induced pili in natural transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *Bioessays*, **37**, 426-435 (2015).
- 86) Piepenbrink KH: DNA Uptake by Type IV Filaments. *Front Mol Biosci*, **6**, 1 (2019).
- 87) Schwechheimer C, Kuehn MJ: Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol*, **13**, 605-619 (2015).
- 88) Mell JC, Hall IM, Redfield RJ: Defining the DNA uptake specificity of naturally competent *Haemophilus influenzae* cells. *Nucleic Acids Res*, **40**, 8536-8549 (2012).
- 89) Zlamal JE, Leyn SA, Iyer M, Elane ML, Wong NA, Wamsley JW, Vercruyse M, Garcia-Alcalde F, Osterman AL: Shared and unique evolutionary trajectories to ciprofloxacin resistance in gram-negative bacterial pathogens. *mBio*, **12**, e0098721 (2021).
- 90) 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. Tanaka E, Wajima T, Noguchi N.

Earlier generation quinolones can be useful in identifying *Haemophilus influenzae* strains with low susceptibility to quinolone isolated from paediatric patients.

Journal of Medical Microbiology, **68**: 1227-1232 (2019)

2. Tanaka E, Wajima T, Uchiya K, Nakaminami H.

Quinolone resistance is transferred horizontally via uptake signal sequence recognition in *Haemophilus influenzae*.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **66**: e0196721 (2022)

3. Tanaka E, Wajima T, Nakaminami H, Uchiya K.

Alternative quinolone-resistance pathway caused by simultaneous horizontal gene transfer in *Haemophilus influenzae*.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **77**: 3270-3274 (2022)