

称号及び氏名 博士(獣医学) 藤村 享滋

学位授与の日付 平成20年6月30日

論文名 Studies on mechanism of increase of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and *in vitro* antibacterial activity of S-3578, a novel cephalosporin, against methicillin-resistant staphylococci (黄色ブドウ球菌におけるメチシリン高度耐性化の機序および新規セファロスポリン S-3578 のメチシリン耐性ブドウ球菌に対する *in vitro* 抗菌活性に関する研究)

論文審査委員 主査 山崎 伸二
副査 小崎 俊司
副査 竹内 正吉

論文要旨

諸言

黄色ブドウ球菌は、ヒトの皮膚や咽頭、副鼻腔などからよく検出される常在菌であり、化膿性疾患を引き起こす病原菌である。家畜においては、特に牛乳房炎の代表的起炎菌であり、伝染性が強いので、その対策が講じられている。ヒトの場合、1980年代半ばから1990年代にかけて、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) による院内感染症の報告が国内で急増し、医療問題として注目された。MRSAは、 β -ラクタム系抗菌薬だけでなく、アミノ配糖体系やキノロン系薬なども含め多剤耐性を示す場合が多く、治療を難渋化させている。また、MRSAの蔓延を機に、感染防止に向けた院内感染対策の検討や有効な抗菌薬の開発へと繋がっていった。

β -ラクタム系薬は細胞壁合成を担うペニシリン結合蛋白 (PBP) を阻害して抗菌力を発揮する。一方、MRSAは、メチシリン感性黄色ブドウ球菌 (MSSA) にはなく、 β -ラクタム系薬との親和性の低い PBP2' (又は PBP2a) を保有するため、 β -ラクタム系薬存在下でも細胞壁を合成できることから耐性を示すことが分かっている。しかし、MRSA 臨床分離株には、メチシリンの最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) が 6.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度の中等度耐性株 (low-level MRSA) から、1,600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度の高度耐性株 (high-level

MRSA) まで存在する。当初、臨床分離株の殆どが low-level MRSA であったが、メチシリン高度耐性化が進み、近年の臨床分離株は high-level MRSA が大部分を占めており、 β -ラクタム系薬による MRSA 感染症治療は不可能となった。この幅広いメチシリン耐性度は PBP2' の発現量やそれをコードする *mecA* 遺伝子あるいはその周辺遺伝子の差異ではないことが明らかにされ、他の遺伝因子の関与が示唆されてきたが、その詳細は不明であった。

Low-level MRSA 株のポピュレーション中には 10^4 から 10^6 個の細胞に 1 個という比較的高い頻度で高度耐性株が出現し、この現象はヘテロ耐性と呼ばれている。臨床での β -ラクタム系薬使用下において、このヘテロ耐性により low-level MRSA 株から high-level MRSA 株が選択されたと考えられている。本研究では、このメチシリン高度耐性化に関わる遺伝子変異を解析し、その機序を解明するとともに、high-level MRSA 臨床分離株にも作用する新規 β -ラクタム系薬の *in vitro* 抗菌活性を検討した。

第 1 章 溶菌酵素をコードする遺伝子の欠損による MRSA のメチシリン高度耐性化

高度耐性化の因子を見出すため、まず、ヘテロ耐性を示す low-level MRSA 臨床分離株 SR17238 (メチシリン MIC 6.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) から、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のメチシリン含有寒天培地上で選択して high-level MRSA 変異株 SRM1648 (同 1,600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を得た。次に、両株の染色体 DNA を核酸の二次元電気泳動法である restriction landmark genomic scanning 法で比較し、両株間で差異が認められた部位を見出し、クローニングして塩基配列を解析した。その結果、SRM1648 株では、*rel*, *orf1*, *lytH* の 3 つの連なった遺伝子領域 (*rel-lytH* 領域) において 1.6 kb の欠損が生じていることが分かった。ホモロジー検索から *rel* は他の菌種で stringent response に関わる guanosine 5',3'-pyrophosphate [(p)ppGpp] の合成及び分解酵素を、*lytH* は溶菌酵素 *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase をコードすると推定した。

rel-lytH 領域における欠損によりメチシリン高度耐性化が起きることを確認するために、SRM1648 株の *rel-lytH* 領域を *S. aureus* のプラスミド pSR100 に組み込み構築した pSR108 を用いて、SR17238 株を形質転換して SRM1665 株 (SR17238/pSR108) を得た。SRM1665 株に対するメチシリンの MIC は親株とほとんど変わらない 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示し、中等度耐性のままであった。同株を $1/2 \times \text{MIC}$ のメチシリン含有液体培地中で 24 時間培養した後、薬剤を含まない寒天上でコロニーを形成させ、染色体中の *rel-lytH* 領域を PCR 法で調べたところ、SRM1648 と同様の 1.6 kb の欠損が生じているコロニーが容易に得られることが分かった。さらに、それらに対するメチシリンの MIC は 1,600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と高度耐性を示していた。導入プラスミド上の欠損を有する *rel-lytH* 領域と染色体上の正常な *rel-lytH* 領域が組み換わり、染色体上の同領域が欠損していたことから、この *rel-lytH* 領域の欠損が高度耐性化を引き起こすことが示された。

rel-lytH 領域に欠損変異が生じる頻度を調べたところ、SR17238 株を 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のメチシリン含有寒天平板上で形成させたコロニー 1,900 個中、14 個で同遺伝子領域に欠損が見られ、いずれの株もメチシリンの MIC は 1,600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上を示した。そのうち 13 個は SRM1648 と同様の 1.6 kb の欠損であったが、1 個 (SRM1663 株) は *lytH* 内で 0.5 kb の欠損が生じていた。このことから、高度耐性化に関わる因子は *lytH* と考えられた。これにより、初めてメチシリン高度耐性化に関わる遺伝因子を単離し、その欠損変異により高度耐性化することを解明した。

第2章 IS1182による *lytH*の挿入変異によりメチシリン高度耐性化した *S. aureus* 臨床分離株

lytH 遺伝子の欠損による高度耐性化は SR17238 株特有の現象ではなく、他の臨床分離株でも起こり得ることを確認するため、まずプラスミド pSR108 を4株の low-level MRSA 臨床分離株 SR20118, SR20137, SR20202, SR20280 に導入して形質転換株を構築した。これらの形質転換株では、400 µg/mL のメチシリン含有寒天培地上に生じる高度耐性変異株の出現頻度が、親株よりも3~84倍上昇し、さらに、得られた高度耐性株の58.3~100%で、pSR108 と染色体間の組換えにより、染色体上の *rel-lytH* 領域に欠損変異が生じていることが判明した。また、*lytH* 遺伝子内に0.5 kbの欠損を持つ SRM1663株の *lytH* 遺伝子領域をプラスミド pSR100 に組み込み構築した pSR616 を用いて、SR20280株を形質転換した株では、SR20280株に比べて400 µg/mL のメチシリン含有寒天培地上に生じる高度耐性変異株の出現頻度が2倍に上昇した。以上のことから、SR17238と同様に *lytH* 遺伝子変異による高度耐性化が他の low-level MRSA 臨床分離株でも起こりうることを示唆された。

さらに、high-level MRSA 臨床分離株において *lytH* 変異によりメチシリン高度耐性化した株が存在するかを調べるために、127株の high-level MRSA 臨床分離株の *rel-lytH* 領域をPCR法で検索した。その結果、*lytH* 内に挿入配列 (insertion sequence: IS) IS1182 が挿入している1株 (SR17164株) を見出した。*lytH* 遺伝子の塩基配列には22 bpからなる1組の inverted repeat sequence があり、この部分が欠損し、代わって IS が挿入することにより *lytH* 遺伝子が不活化されていた。同株における *lytH* の IS 挿入変異のメチシリン耐性に及ぼす影響度を調べるため、*lytH*:IS1182 領域を *lytH* に組み換えた株を構築して感受性を調べたところ、メチシリンの MIC は1,600 µg/mL から800 µg/mL にしか低下しなかった。一方、細菌表層のテイコ酸リンカー部位の合成に関わる *llm* 遺伝子をトランスポゾン挿入変異により不活化させると、high-level MRSA 臨床分離株のメチシリン耐性度は著しく低下することが知られている。しかし、SR17164株では *llm* 遺伝子をトランスポゾン Tn918 の挿入で不活化させても高度耐性を維持していた。この特性は *lytH* 変異株である SRM1648 や SRM1663 でも同様に観察されたことから、*lytH* 変異株に限った特性であると考えられた。従って、SR17164株の高度耐性には *lytH* 変異が関与していることが確認され、さらに他の何らかの因子の関与も示唆された。SR17164 はメチシリン高度耐性化の遺伝的背景が解明された初めての臨床分離株である。

第3章 メチシリン耐性ブドウ球菌に活性を有する新規セファロsporin S-3578の *in vitro* 抗菌活性

MRSA臨床分離株におけるメチシリン高度耐性化には多くの因子が関与していることが分かってきたことから、そうした菌株にも優れた抗菌活性を示す新規セファロsporin, S-3578 (7β-[2-(2-aminothiadiazol-4-yl)-2-(*Z*)-ethoxyiminoacetamido]-3-(1-*N*-methylaminopropyl-1*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridinium-4-yl)-methylcephalosporin) を見出し、特に本化合物の抗MRSA活性に着目しながら、*in vitro* 抗菌活性を評価した。S-3578は *S. aureus* や *Pseudomonas aeruginosa* などの様々な好気性および嫌気性菌の臨床分離株に対

して幅広い抗菌スペクトルを有していた。さらに、現在では臨床において分離されるMRSA株の殆どがhigh-level MRSAであるが、それらを含めてMRSA臨床分離株に対するS-3578のMIC₉₀ (90%の菌株の増殖を抑制するMIC) は4 µg/mLを示し、強い抗MRSA活性を有していた。β-ラクタム系薬耐性の主因子であるPBP2'に対するS-3578の50%阻害濃度 (IC₅₀) は4.5 µg/mLを示し、優れた親和性を有していたことから、S-3578は他のPBPに加えてPBP2'も阻害することにより抗MRSA活性を発揮していると考えられた。また液体培地中でS-3578に暴露された菌株の経時的な生菌数測定や最小殺菌濃度 (MBC) 測定による殺菌力評価試験から、S-3578のMRSAに対する殺菌力は、MSSAに対する殺菌力と大差がなく、強い抗菌力に殺菌力が伴っていることが示された。Low-level MRSA及びhigh-level MRSA臨床分離株のポピュレーション解析において、両株ともにS-3578の暴露により生菌数は顕著に減少し、他の20株の臨床分離株でも2×MICのS-3578を含む寒天培地上でコロニーは出現しなかったことから、S-3578の耐性出現頻度は極めて低いと推察された。以上のことから、S-3578は優れた抗MRSA活性を有する広域セファロスポリン化合物と考えられた。

総括

MRSAのメチシリン高度耐性化の機序の解明を行ったところ、以下のことを明らかにした。

- ・メチシリン高度耐性化に関与する遺伝子の一つとして、溶菌酵素をコードすると思われる *lytH* 遺伝子が初めて同定され、その不活化により高度耐性化が起きることが分かった。
- ・実際に、メチシリン高度耐性を示すMRSA臨床分離株から、その高度耐性に *lytH* 遺伝子の不活化が関与している株を見出した。
- ・ *lytH* 遺伝子の不活化には欠損変異やISの挿入変異といった多様な変異様式が関わっていた。

さらに現在、殆どのMRSA臨床分離株はメチシリン高度耐性を示すが、それらにも有効な新規セファロスポリンS-3578の *in vitro* 抗菌活性を検討し、以下のことが分かった。

- ・S-3578はメチシリン耐性の主因子であるPBP2'に強い親和性を持ち、MRSA臨床分離株に優れた *in vitro* 抗菌力、殺菌力を有していた。
- ・Low-level MRSA及びhigh-level MRSAともに、S-3578に対する耐性コロニーの出現頻度は極めて低いと考えられた。

本研究において、長年不明であったMRSAのメチシリンに対する高度耐性化の機序の一端を初めて解明し、しかも高度耐性化している臨床分離株からその変異を見出した意義は大きい。他にも高度耐性化に関与する因子の存在が推察されたが、それらの解明は今後の課題である。また、LytHの正確な機能についてはまだ確認できていないが、細胞壁を分解する溶菌酵素であることが推察されたこと、メチシリンを含むβ-ラクタム系薬の作用機序が細胞壁合成の阻害であること、*lytH* 遺伝子と *llm* 遺伝子の変異との間に何らかの関係が示唆されたことから、*lytH* 遺伝子の不活化は細菌細胞壁を含む細菌表層の構築に影響を及ぼし、メチシリン高度耐性化を引き起こした可能性が考えられた。現在、臨床現場でMRSAによる感染症に有効な抗菌薬が少なく、優れた抗MRSA活性を持つS-3578が創製されたことは極めて意義深い。今後、こうした新規抗菌薬の開発が進み、臨床現場で役立つこと

が期待される。

審査結果の要旨

黄色ブドウ球菌は、ヒトの皮膚や咽頭、副鼻腔などから検出される常在菌であり、化膿性疾患を引き起こす病原菌である。家畜においては、特に牛乳房炎の代表的起炎菌であり、伝染性が強いことその対策が講じられている。ヒトの場合、1980年代半ばから1990年代にかけて、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）による院内感染症の報告が国内で急増し、医療問題として注目された。MRSAは、 β -ラクタム系抗菌薬だけでなく、アミノ配糖体系やキノロン系薬なども含め多剤耐性を示す場合が多く、治療を難渋化させている。また、MRSAの蔓延を機に、感染防止に向けた院内感染対策の検討や有効な抗菌薬の開発へと繋がっていった。

β -ラクタム系薬は細胞壁合成を担うペニシリン結合蛋白（PBP）を阻害して抗菌力を発揮する。MRSAは、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌（MSSA）にはない β -ラクタム系薬との親和性の低いPBP2'（又はPBP2a）を保有するため、 β -ラクタム系薬存在下でも細胞壁を生合成できることから、耐性を示すことが明らかとなっている。しかし、MRSA臨床分離株には、メチシリンの最小発育阻止濃度（MIC）が6.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度の中等度耐性株（low-level MRSA）から、1,600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度の高度耐性株（high-level MRSA）まで存在する。当初、臨床分離株の殆どがlow-level MRSAであったが、メチシリン高度耐性化が進み、近年の臨床分離株ではhigh-level MRSAが大部分を占めており、 β -ラクタム系薬によるMRSA感染症治療は不可能となった。この幅広いメチシリン耐性度はPBP2'の発現量やそれをコードする*mecA*遺伝子あるいはその周辺遺伝子の差異ではないことが明らかにされ、他の遺伝因子の関与が示唆されてきたが、その詳細は不明であった。一方、Low-level MRSA株のポピュレーション中には 10^4 から 10^6 個の細胞に1個という比較的高い頻度で高度耐性株が出現し、この現象はヘテロ耐性と呼ばれている。臨床での β -ラクタム系薬使用下において、このヘテロ耐性によりlow-level MRSA株からhigh-level MRSA株が選択されたと考えられている。

申請者は、MRSAの高度耐性化機構を明らかにし、high-level MRSA株に対する治療薬の開発を目的として、1) このメチシリン高度耐性化に関わる遺伝子変異を解析し、2) 高度耐性化に関わる機序を解明するとともに、3) high-level MRSA臨床分離株にも作用する新規 β -ラクタム系薬の*in vitro*抗菌活性を検討した。

第1章では、MRSA の高度耐性化因子を見出すことを目的に、ヘテロ耐性を示す low-level MRSA 臨床分離株 SR17238(メチシリン MIC 6.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)から、high-level MRSA 変異株 SRM1648(同 1,600 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を得た。Restriction landmark genomic scanning 法を用いて両株の染色体 DNA の遺伝的差異を比較し、1.6 kb の *rel*, *orf1*, *lytH* の 3 つの連なった遺伝子領域 (*rel-lytH* 領域) の欠損が高度耐性化に寄与していることを見いだした。さらに、この中の溶菌酵素 *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase をコードする *lytH* 遺伝子の欠損変異が高度耐性化に関わっていることを明らかにした。

第2章では、*lytH* 遺伝子の欠損が SR17238 株に特有な現象でなく、他の臨床分離 MRSA 株においても高度耐性化に寄与しているかどうかを調べることを目的とした。*rel-lytH* が欠失した遺伝子を持つ pSR108 を low-level MRSA 臨床分離株に形質転換したところ high-level MRSA 株が出現した。さらに、high-level MRSA 臨床分離株 127 株について調べたところ、1 株で *lytH* 遺伝子内に IS1182 が挿入している株が見つかり、*lytH* の変異が高度耐性化に寄与している可能性が示された。*lytH*:IS1182 領域を *lytH* に組み換えた株を作製しメチシリンに対する感受性を調べたところ、MIC は 1,600 から 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までしか下がらなかった。以上の結果より、MRSA の高度耐性化に *lytH* が関与しているものの、その他の因子も関与している可能性が示された。

第3章では、様々な high-level MRSA 臨床分離株及びその他の好気性及び嫌気性の臨床分離株を用いて新規セファロsporin薬、S-3578 の *in vitro* 抗菌活性を調べることを目的とした。その結果、S-3578 は調べた全ての菌に対して強い抗菌活性を示すだけでなく、low-level MRSA 及び high-level MRSA 臨床分離株のポピュレーション解析において、両株ともに S-3578 の暴露により生菌数は顕著に減少し、他の 20 株の臨床分離株でも 2 \times MIC の S-3578 を含む寒天培地上でコロニーが出現しなかったことから、S-3578 に対する耐性出現頻度は極めて低いことも明らかとなった。

本研究において、MRSA のメチシリンに対する高度耐性化に *lytH* が関係していること及び高度耐性化している臨床分離株から *lytH* の変異を見出した意義は大きい。また、新規化合物、S-3578 が高度耐性化した MRSA に対して極めて強い抗菌活性を示すことを見いだした。本研究によって得られた知見は、長年不明であった MRSA のメチシリンに対する高度耐性化機序の一端を初めて明らかとただけでなく MRSA に対して耐性出現頻度が低くかつ強い抗菌活性を示す新規化合物を見いだしたことは、獣医学領域のみならず医学領域における化学療法及び感染症治療の発展に大きく貢献するものと評価できる。本論文の審査および学力確認の結果をあわせて博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。