

【原著・臨床】

尿路感染症主要原因菌のフルオロキノロン系抗菌薬を中心とした薬剤に対する感受性 および *gyrA*・*parC* における QRDR の遺伝子変異の解析

家田 健史¹⁾・榎原 京子²⁾・森本 ゆふ²⁾・久末 伸一¹⁾
伊藤 輝代²⁾・堀江 重郎¹⁾・平松 啓一²⁾

¹⁾ 順天堂大学大学院泌尿器外科学講座*

²⁾ 順天堂大学医学部細菌学/感染制御科学講座

(平成 26 年 9 月 22 日受付・平成 27 年 1 月 5 日受理)

われわれは順天堂医院泌尿器科患者より分離された尿路感染症の原因菌を解析した。グラム陰性菌のなかで主要なものは、*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* の 3 菌種であった。これら 3 菌種の薬剤感受性試験の結果、特に *E. coli* におけるフルオロキノロン耐性率の上昇が顕著であった。

そこで CPF_X (ciprofloxacin), LVF_X (levofloxacin) の最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration : MIC) 0.25 μg/mL 以上を示した *E. coli* 46 株の *gyrA* および *parC* 遺伝子の QRDR (quinolone resistance determining region) 領域の塩基配列を解析した。結果、*gyrA*・*parC* ともに変異が存在しない株が 8 株、*gyrA* または *parC* の 1 カ所のアミノ酸変異株が 14 株、3 カ所の変異株が 9 株、4 カ所の変異株が 15 株であった。MIC 16~32 μg/mL では変異数 4 カ所の株が高頻度で出現したのに対し、MIC 64 μg/mL 以上では出現頻度の低下が認められ、*gyrA* 遺伝子、*parC* 遺伝子における QRDR の変異以外のメカニズムも関与する可能性が考えられる。

Key words: urinary tract infection, *Escherichia coli*, fluoroquinolone, *gyrA* genes, *parC* genes

尿路感染症 (urinary tract infection : UTI) の治療は抗菌薬の投与によって行われるが、現在 UTI に対する抗菌薬で最も多用されているのはフルオロキノロン (fluoroquinolone : FQL) 系薬である。しかし近年、FQL 耐性 *Escherichia coli* の分離頻度の増加が懸念されている。

本調査においても FQL 耐性 *E. coli* の分離頻度が高値であったため、さらに、耐性獲得の機序を考察するために FQL 系薬の標的である DNA gyrase サブユニット遺伝子の *gyrA* および topoisomerase IV サブユニット遺伝子の *parC* のキノロン耐性決定領域 (quinolone resistance determining region : QRDR) の変異を検討した。

I. 材料と方法

2012 年 6 月から 12 月まで順天堂大学付属順天堂医院泌尿器科より提出された尿検体のうち 10⁵ CFU/mL 以上の菌量で分離した菌株 222 株において、患者・菌種が両方とも重複する菌株を除外した計 214 株を用いた。また、尿検体は無症候性細菌尿も含めた。菌株採取においては倫理審査委員会承認番号順大医倫第 2012053 として承認された。FQL 耐性 *E. coli* における患者背景比較には Fisher 検定を用いた。

1. 薬剤感受性試験

最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration : MIC) の測定は CLSI 標準法の寒天平板希釈法で行った。供試薬剤は sulbactam/ampicillin (SBT/ABPC), piperacillin (PIPC), cefazolin (CEZ), cefmetazole (CMZ), cefepime (CFPM), ceftriaxone (CTRX), ciprofloxacin (CPF_X), levofloxacin (LVF_X), meropenem (MEPM), imipenem (IPM), doripenem (DRPM), minocycline (MINO), arbekacin (ABK), gentamicin (GM), および vancomycin (VCM) の 15 薬剤 (Sigma 社) を用い、標準株として *E. coli* (ATCC25922) を用いた。耐性・中間群・感受性の判定は CLSI2012 のブレイクポイント¹⁾に従い判定を行った。

2. *gyrA* および *parC* キノロン耐性決定領域の解析

MIC を測定した 82 株の *E. coli* のうち、CPF_X または LVF_X の MIC が 0.25 μg/mL 以上を示した菌株 46 株について、*gyrA* および *parC* の QRDR における塩基配列を解析し、変異の有無を調べた。まず、Giraud らの報告に基づき PCR 法を行い、*gyrA* および *parC* の検出を行った。プライマーは *gyrA* 検出用として (5'-TGCCAGATGTCCGAGAT-3') および (5'-AAATCGACCGTCTCT

*東京都文京区本郷 3-1-3

Table 1. Background of patients

		Number of patients	(%)
In patients		13	6.0
Out patients		201	94.0
Pre-medication	Pre-medication	7	3.3
	No pre-medication	207	96.7
Sex	Male	103	48.4
	Female	111	51.6
Age	20-29	12	5.6
	30-39	23	10.7
	40-49	13	6.0
	50-59	30	14.0
	60-69	38	17.7
	70-79	54	25.6
	80-	44	20.5
Total		214	100.0

Table 2. Bacteria isolated from urinary tract infection

Organism	Uncomplicated urinary tract infection		Complicated urinary tract infection		Total		
	Isolates	(%)	Isolates	(%)	Isolates	(%)	
Gram-negative bacilli	<i>Escherichia coli</i>	53	62.4	29	22.5	82	38.3
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	4.71	8	6.20	12	5.61
	<i>Enterobacter, Citrobacter</i>	3	3.53	10	7.75	13	6.07
	<i>Proteus mirabilis</i>	1	1.17	2	1.55	3	1.40
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0.00	10	7.75	10	4.67
	Other Gram-negative bacillus	0	0.00	8	6.20	8	3.73
	Subtotal	61	71.8	67	51.9	128	59.8
	Gram-positive cocci	<i>Enterococcus faecalis</i>	7	8.24	24	18.6	31
Other <i>Enterococcus</i>		0	0.0	2	1.55	2	0.934
<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)		3	3.53	8	6.20	11	5.14
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)		0	0.0	3	2.33	3	1.40
Other <i>Staphylococcus</i>		8	9.41	10	7.75	18	8.41
<i>Streptococcus</i> spp.		6	7.06	15	11.6	21	9.81
Subtotal		24	28.2	62	48.1	86	40.2
Total	85	100	129	100	214	100	

TTTT-3'), *parC* 検出用として (5'-TTATTGGTGATA GTCTGAAA-3') および (5'-AATAGCAGCTCGGAAT ATTT-3') を用いた。PCR 産物は BigDye[®] Terminator Ver.3.1 Cycle Sequencing kit (Life Technologies) を用いたダイレクトシーケンス法により Applied Biosystems[®] 3500xL (Life Technologies) で塩基配列を決定した。なお、決定した塩基配列は、wild-type *E. coli* (K-12 MG1655 株) の *gyrA* (ID: B2231) および *parC* (ID: B3019) と比較し、アミノ酸置換部位を調べた。

II. 結 果

1. 供試菌株の由来

解析症例 214 例についての患者背景を Table 1 に示した。入院患者症例 13 例に対し外来患者症例 201 例とほぼ外来患者由来株であった。また、検体採取 1 カ月前までの前治療抗菌薬ありの割合は 3.3% と低く、抗菌薬投与

の影響は少ないと考えられた。男女比は男性 103 例、女性 111 例と有意差を認めず、年齢中央値は 67 歳、70 歳以上の占める割合が 46.1% と多く認められた。

2. 供試菌株の薬剤感受性

供試菌株の内訳を Table 2 に示した。グラム陰性菌 128 株、グラム陽性菌 86 株であり、グラム陰性菌では *E. coli* (38.1%), *Klebsiella pneumoniae* (5.6%) が多く、グラム陽性菌は *Enterococcus faecalis* (14.4%) を代表とする *Enterococcus* 属と *Staphylococcus* 属であった。原因菌を単純性尿路感染症患者由来、複雑性尿路感染症患者由来と大別した場合、おのおの 85 株、129 株であった。単純性尿路感染症の原因菌 85 株中では、*E. coli* (62.4%), *E. faecalis* (8.2%), *K. pneumoniae* (4.7%) の順に高い割合を占め、複雑性尿路感染症の場合は *E. coli* (22.5%), *E. faecalis* (18.6%), *Pseudomonas aeruginosa* (7.8%), *K. pneumoniae*

Table 3. Susceptibility testing in gram-negative bacteria

		MIC ($\mu\text{g/mL}$)			Susceptibility (%)	
		range	50%	90%	Susceptible	Resistant
<i>Escherichia coli</i> (n = 82)	SBT/ABPC	0.25-128	4	64	73.2	19.5
	PIPC	1->128	4	>128	71.9 (82.5)	15.9 (15.5)
	CEZ	1->128	2	>128	62.1 (85.7)	14.6 (7.4)
	CMZ	0.5-4	2	4	100.0 (98.2)	0.0 (0.5)
	CFPM	<0.06-32	<0.06	8	91.4	4.8
	CTRX	<0.06->128	<0.06	2	86.6	9.8
	CPFX	<0.06-128	0.25	64	64.6 (84.3)	32.9 (15.7)
	LVFX	<0.06-128	0.25	32	64.6 (84.8)	26.8 (12.9)
	MEPM	<0.06-4	<0.06	0.125	97.6 (100.0)	2.4 (0.0)
	IPM	<0.06-8	0.125	1	97.6 (100.0)	2.4 (0.0)
	DRPM	<0.06-0.5	<0.06	0.25	100.0	0.0
	MINO	0.125-64	2	16	82.9 (89.9)	12.2 (5.1)
	ABK	0.125-64	1	4	97.6	1.2
GM	0.25->128	2	16	87.8	12.2	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 12)	SBT/ABPC	4-64	4	64	66.6	25.0
	PIPC	4->128	4	>128	66.6 (83.0)	33.3 (6.7)
	CEZ	1->128	2	>128	75.0 (78.7)	25.0 (19.1)
	CMZ	1-8	1	4	100.0 (93.6)	0.0 (4.3)
	CFPM	<0.06-4	1	4	100.0	0.0
	CTRX	<0.06->128	0.125	>128	66.6	25.0
	CPFX	<0.06-1	0.125	1	91.7 (89.4)	8.3 (10.6)
	LVFX	<0.06-2	0.125	2	91.7 (91.5)	8.3 (8.5)
	MEPM	<0.06-0.125	<0.06	<0.06	100.0 (97.9)	0.0 (0.0)
	IPM	0.5-1	0.5	1	100.0 (95.7)	0.0 (2.1)
	DRPM	<0.06-0.125	<0.06	<0.06	100.0	0.0
	MINO	2-64	4	64	58.3 (83.0)	33.3 (10.6)
	ABK	0.5-4	1	2	100.0 (97.9)	0.0 (2.1)
GM	0.5-64	0.5	2	91.7 (97.9)	8.3 (2.1)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 10)	PIPC	4->128	4	16	90.0 (61.8)	10.0 (18.2)
	CFPM	1-16	1	8	90.0	0.0
	CPFX	<0.06-16	0.25	8	80.0 (63.6)	20.0 (34.5)
	LVFX	0.5-16	1	8	80.0 (58.2)	10.0 (22.7)
	MEPM	<0.06-0.5	0.25	0.5	90.0 (74.5)	10.0 (21.8)
	IPM	0.125-1	1	1	90.0 (76.4)	10.0 (18.2)
	ABK	0.5-2	1	2	100.0 (92.7)	0.0 (8.3)
	GM	1-64	2	4	90.0 (80.0)	10.0 (22.7)

(6.2%)であり、*P. aeruginosa*の占める割合が増加していた。また、グラム陰性菌とグラム陽性菌の検出頻度は単純性尿路感染症でのおおの71.8% (61株)、28.2% (24株)、複雑性尿路感染症でのおおの51.9% (67株)、48.1% (62株)であった。

薬剤感受性試験の結果をMIC分布、MIC₅₀、MIC₉₀、感受性率、耐性率で表示した (Table 3)。感受性率、耐性率において括弧内は2003年に全国14施設における719菌株を対象に行った調査²⁾での値である。グラム陰性菌3菌種の薬剤感受性試験の結果では、感受性率が90%未満であった薬剤は、*E. coli*ではSBT/ABPC、PIPC、CEZ、CTRX、CPFX、LVFX、MINO、GMであり、*K. pneumoniae*では、SBT/ABPC、PIPC、CEZ、MINO、*P. aeruginosa*ではCPFX、LVFXであった。*E. coli*では、*K. pneumoniae*に比較してCFPM、CPFX、LVFX、MEPM、IPM、ABK、GMにおいて耐性率の高値を認めた。また、*E. coli*におい

てセフェム系薬であるCEZ、CMZ、CFPM、CTRXの耐性率はのおおの14.6%、0.0%、4.8%、9.8%であったのに対し、FQL系薬であるCPFX、LVFXの耐性率はのおおの32.9%、26.8%と耐性菌の出現が著明であった。感受性率、耐性率を2003年に719菌株を対象に行われた研究と比較してみると、グラム陰性桿菌において、本調査では*E. coli*におけるFQL系薬の耐性率、*K. pneumoniae*におけるペニシリン系薬の耐性率が高値となった。

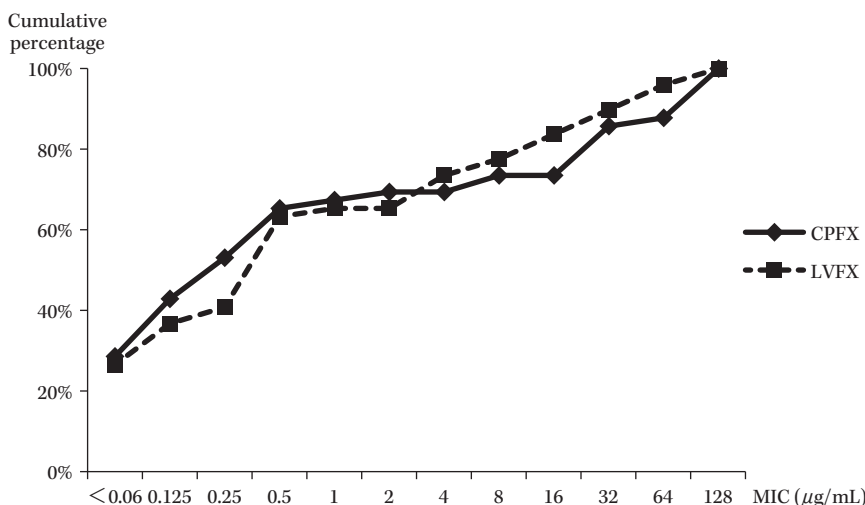
3. FQL系薬耐性*E. coli*の解析

1) 患者背景

Table 4にFQL系耐性*E. coli*を分離した患者 (以下FQL耐性群)の背景を、FQL系感受性*E. coli*を分離した患者 (以下感受性群)の背景と比較して示した。男女別では男性の占める割合はFQL耐性群 (43.3%)が感受性群 (15.4%)よりも有意に高率となった ($p=0.0082$)。複雑性尿路感染症の占める割合はFQL耐性群 (53.3%)の

Table 4. A comparison of patient background, fluoroquinolone susceptible-strains and resistant-strains

		Susceptible	(%)	Resistant	(%)
Sex	Male	8	15.4%	13	43.3%
	Female	44	84.6%	17	56.7%
Urinary tract infection	Uncomplicated	39	75.0%	14	46.7%
	Complicated	13	25.0%	16	53.3%
Age	20-39	10	19.2%	7	23.3%
	40-59	16	30.8%	6	20.0%
	60-79	19	36.5%	12	40.0%
	80-	7	13.5%	5	16.7%
Total		52	100.0%	30	100.0%

Fig. 1. Sensitivity distribution of clinical isolates of *Escherichia coli* to CPFX and LVFX.Table 5. Substitutions identified in the *gyrA* and *parC* containing QRDRs in clinical isolates of *E. coli*

Mutation points	Amino acid substitution				Isolates
	<i>gyrA</i>		<i>parC</i>		
0	None				8
1	S83L				13
1			S80I		1
Subtotal					14
3	S83L	D87N	S80I		6
3	S83L	D87G	S80I		1
3	S83L	S80I		E84V	1
3	S83L	S80I		E84G	1
Subtotal					9
4	S83L	D87N	S80I	E84V	12
4	S83L	D87N	S80I	E84G	2
4	S83L	D87N	S80I	E84K	1
Subtotal					15
Total					46

ほうが感受性群 (25.0%) よりも有意に高率となった ($p=0.0159$)。年齢別では 20~39 歳, 40~59 歳, 60~80 歳, 80 歳以上の占める割合は FQL 耐性群ではおのおの

23.3%, 20.0%, 40.0%, 16.7% であり, 感受性群ではおのおの 19.2%, 30.8%, 36.5%, 13.5% と FQL 耐性群と感受性群と比較して年齢別に有意な差は認められなかった。

2) FQL 系薬に対する *E. coli* の MIC 値

Fig. 1 に FQL 系薬に対する *E. coli* における MIC 累積百分率のグラフを示した。LVFX の場合, MIC 値が 0.0625~0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では, 徐々に増加し, 0.5~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲では増加がみられず, また 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上になると徐々に増加した。CPFX の場合もほぼ同様であり, 0.0625~0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までは徐々に増加し, 0.5~4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲では増加がみられず, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上になると徐々に増加したが, LVFX に比べて耐性菌の増加がみられたのが, やや高濃度側にシフトしていた。

3) QRDR におけるアミノ酸置換の頻度

QRDR におけるアミノ酸置換の変異数と菌株数を Table 5 に示した。*gyrA*・*parC* ともに変異を示さない株は 8 株確認された。アミノ酸置換が 1 カ所の株は *gyrA* の 83 位の Ser から Leu への置換 (S83L, 以下同様に略す) がある株が 13 株, *parC* の S80I がある株は 1 株確認され

Table 6. MICs and numbers of substitutions identified in the *gyrA* and *parC* genes

MIC ($\mu\text{g/mL}$)	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
<i>gyrA</i> substitution	0	2	5	4	0	1	0	3	2	10	4	6
<i>parC</i> substitution	0	0	0	0	0	0	0	2	2	10	5	6
0 point substitution	0	0	2	4	1	0	0	0	0	1	0	0
CPFX												
1 point substitution	0	2	5	4	0	1	0	1	0	0	1	0
3 point substitution	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	3
4 point substitution	0	0	0	0	0	0	0	1	1	9	1	3
Numbers of isolates	0	2	7	8	1	1	0	3	2	11	5	6
<i>gyrA</i> substitution	0	0	4	6	1	0	5	4	6	5	3	3
<i>parC</i> substitution	0	0	0	0	0	0	4	4	6	5	3	3
0 point substitution	1	0	1	5	1	0	0	0	0	0	0	0
LVFX												
1 point substitution	0	0	4	6	1	0	1	2	0	0	0	0
3 point substitution	0	0	0	0	0	0	2	1	0	2	3	1
4 point substitution	0	0	0	0	0	0	2	2	6	3	0	2
Numbers of isolates	1	0	5	11	2	0	5	5	6	5	3	3

た。アミノ酸置換が2カ所の株は確認されなかった。アミノ酸置換が3カ所の株は *gyrA* の S83L と D87N, および *parC* の S80I がある株が6株, *gyrA* の S83L と D87G, および *parC* の S80I がある株が1株, *gyrA* の S83L, および *parC* の S80I と E84V がある株が1株, *gyrA* の S83L, および *parC* の S80I と E84G がある株が1株確認された。アミノ酸置換が4カ所の株は *gyrA* の S83L と D87N および *parC* の S80I と E84V がある株が12株, *gyrA* の S83L と D87N および *parC* の S80I と E84G がある株が2株, *gyrA* の S83L と D87N および *parC* の S80I と E84K がある株が1株確認された。

4) QRDR におけるアミノ酸置換と MIC 値との関連

MIC 値とアミノ酸置換の変異数との関係を Table 6 に示す。Fig. 1 の MIC 累積百分率と関連させた場合, CPFX, LVFX いずれにおいても $\text{MIC} \leq 2 \mu\text{g/mL}$ すべての株でアミノ酸置換変異数は1カ所以下であった。MIC 16~32 $\mu\text{g/mL}$ では変異数4カ所を認める株が CPFX において 76.9% (10/13), LVFX において 81.8% (9/11) と高頻度であり, MIC 64~128 $\mu\text{g/mL}$ では変異数3カ所を認める株が CPFX において 54.5% (6/11), LVFX において 66.6% (4/6) と高頻度に認められた。

III. 考 察

1. 他施設分離株との比較

近年, 尿路感染症主要原因菌の大規模調査としては熊本らによる 2003 年に全国 14 施設における UTI と診断された 719 菌株を対象に行った研究²⁾と, 松本らによる 2008 年に全国 294 施設を対象に行った膀胱炎患者を対象とした研究³⁾が行われてきた。両調査と本調査を比較したところ, 原因菌の分布はほぼ類似したものとなった。単純性尿路感染症の *E. coli* の分離頻度は 60~80% と報告されている³⁻⁷⁾が, 本調査でも分離頻度は 62.4% となった。一方, 複雑性尿路感染症の原因菌についてはこれまでの報告と同様であり, *E. coli* の他, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* などさまざまな細菌が原因菌となることが確認さ

れた。

本邦では尿路感染症に対する治療薬として使用する薬剤は, セフェム系薬, FQL 系薬をはじめとしてさまざまであるが, セフェム系耐性菌, FQL 系耐性菌の増加が問題になっており, 薬剤感受性の検討薬剤をこれらの薬剤を中心に行った。感性率, 耐性率を 2003 年に 719 菌株を対象に行われた研究²⁾と比較してみると, 本調査では *E. coli* における FQL 系薬の耐性率, *K. pneumoniae* におけるペニシリン系薬の耐性率が高値となった。セフェム系薬, アミノグリコシド系薬, カルバペネム系薬は両調査とも有意差は認められなかった。2003 年の調査²⁾では *E. coli* における FQL 系薬に対する耐性率は CPFX, LVFX でおおの 15.7%, 12.9% であった。また, 2008 年の調査では, 単純性尿路感染症・複雑性尿路感染症に大別した調査を行っているが, 両者を合わせた統計を取ると, FQL 系薬に対する耐性率は CPFX, LVFX でおおの 14.8%, 13.4% であった。この2つの調査に対し本調査での FQL 系薬に対する耐性率は CPFX, LVFX でおおの 32.9%, 26.8% と, FQL 耐性 *E. coli* の増加が著明であった。グラム陽性球菌において, 本調査ではセフェム系薬, FQL 系薬, アミノグリコシド系薬に対する耐性率は低値の項目が多くみられた。カルバペネム系薬に耐性を示す菌株も本調査では低値となったが, 供試菌株を増加させることによって異なる結果が出る可能性も否定できない。

抗菌薬の適正使用には, 原因菌の抗菌薬に対する感受性を確認し, 抗菌薬を使用することが重要であるが, エンピリック・セラピーを行う際には, 適切な抗菌薬を使用するとともに, 耐性菌の出現率・出現率の変化を敏感にとらえ, 把握することが重要である。また, FQL 耐性 *E. coli* 群では, 感受性群と比較し男性・複雑性尿路感染症の割合が増加を認めた。FQL 耐性 *E. coli* 群は感受性群と比較し男性・60 歳以上の高齢者の割合が多いという報告もあり⁸⁾, 本調査では 60 歳以上の高齢者については

有意な差は認めなかった ($p=0.6485$)。FQL 耐性 *E. coli* を分離する症例では、自己の腸内の *E. coli* による感染以外にも、尿路の器質的および機能的障害などが関与している可能性が示唆される。

2. FQL 耐性獲得機序に対する考察

E. coli の FQL 耐性機構としては DNA ジャイレースのサブユニット A をコードする *gyrA* 遺伝子と Topoisomerase IV のサブユニット A をコードする *parC* 遺伝子の変異のうち、QRDR 領域の変異が代表的なものとして知られている。*gyrA* では 83Ser と 87Asp の変異、*parC* では 80Ser と 84Glu の変異が生じることにより FQL 耐性を獲得するが、*E. coli* においては *gyrA* が第一標的となり FQL 耐性が獲得されることが知られている。また、置換の数が多くなるにつれて FQL 系薬の MIC が上昇する傾向にある⁹⁾。

本解析でも、MIC $\leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ の菌株では *gyrA* のみの変異株しか認められず、MIC $\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ の菌株で *parC* 変異が生ずるという結果になった。実際に、CPFX の MIC $\leq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.0% (0/19)、LVFX の MIC $\leq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.0% (0/19) とすべてにおいて *parC* 遺伝子変異を認めなかったのに対し、CPFX の MIC $\geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ で 89.2% (25/28)、LVFX の MIC $\geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ で 92.5% (25/27)、と高率に *parC* 遺伝子変異を認めた。

一方で、今回のアミノ酸置換は MIC 別にアミノ酸変異数を見ると CPFX の MIC 16~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では変異数 4 カ所の株が 76.9% (10/13) と高頻度で出現したのに対し、MIC 64~128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 36.3% (4/11) と出現頻度の低下が認められた。同様に、LVFX の MIC 16~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において変異数 4 カ所の株が 81.8% (9/11) に対し、MIC 64~128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 33.3% (2/6) と出現頻度の低下が認められた。2008 年に行われた sitafloxacin (STFX) の MIC と QRDR におけるアミノ酸変異数の関連性の調査³⁾では、STFX の MIC が上昇するにつれて *gyrA* の 83Ser と 87Asp、*parC* の 80Ser と 84Glu のアミノ酸変異総数も増加するという結果であるが、これとは異なる結果が得られている。この相違には FQL の MIC 64~128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の菌株には *gyrA*、*parC* 遺伝子変異の他に、FQL 耐性機構が関与している可能性が考えられる。

キノロン系薬と呼ばれる合成抗菌薬の歴史は 1962 年にナリジクス酸 (Nalidixic acid : NA) から始まり、1986 年、Hirai らにより *E. coli* K-12 株における *gyrA* 遺伝子上の変異が見出され、FQL 耐性遺伝子として *nfxA*、*norA*、*nalA* 遺伝子が発見された¹⁰⁾。また、ブドウ球菌での FQL 耐性研究から topoisomerase IV 上にコードされる *parC* 遺伝子における QRDR の変異が FQL 耐性に関与することも発見¹¹⁾され、FQL の菌体外への排出 (汲み出し) 機能の亢進が菌体内の FQL 蓄積低下をもたらすことも明らかになった。1995 年に Gotoh らは Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) タイプの蛋白質がキノ

ロン系薬の排出に関与していることを明らかにした¹²⁾。1998 年に Martínez-Martínez らはプラスミドにコードされる伝達系のキノロン耐性遺伝子が存在することを明らかにした¹³⁾。耐性遺伝子は *qnr* 遺伝子と呼ばれ、この遺伝子がコードする *Qnr* 蛋白が FQL 薬の DNA-DNA ジャイレースの複合体形成を何らかの形で阻害していると考えられている。さらに近年では、アミノグリコシド修飾酵素の一つである AAC(6')-Ib が、FQL 系薬のピペラジニル基を N-アセチル化することにより FQL 系薬の抗菌力を低下させるという報告もある¹⁴⁾。

E. coli の FQL 耐性機構において、*gyrA* 遺伝子の変異に *parC* 遺伝子の変異が加わることによって、さらに FQL 系薬に中等度から高度耐性となることは *P. aeruginosa* における FQL 耐性機構と類似している¹⁵⁾。本解析でも *gyrA* 遺伝子が第一標的となり耐性化が進み、*parC* 遺伝子の変異が *E. coli* の高度耐性化に関与することが明らかになった。一方で FQL 系薬に対する MIC $\geq 64 \mu\text{g}/\text{mL}$ を示す FQL 高度耐性菌には変異数 4 カ所の株の頻度の低下が認められ、*gyrA* 遺伝子、*parC* 遺伝子における QRDR の変異以外のメカニズムも関与する可能性が考えられる。FQL 耐性 *E. coli* は今後増加することが懸念される¹⁶⁾ため、その動向には注意が必要である。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文 献

- 1) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; M100-S22, CLSI, Wayne, 2012
- 2) 熊本悦明, 塚本泰司, 松川雅則, 国島康晴, 広瀬崇興, 茂田士郎, 他: 尿路感染症分離菌に対する経口ならびに注射用抗菌薬の抗菌力比較 (第 25 報 2003 年)。Jpn J Antibiot 2005; 58: 544-56
- 3) 松本哲朗, 濱砂良一, 石川清仁, 高橋 聡, 安田 満, 速見浩士, 他: 尿路感染症主要原因菌の各種抗菌薬に対する感受性。日化療会誌 2010; 58: 466-82
- 4) 石井建夫, 川村研二, 相原衣江, 徳永亮介, 鈴木孝治: 尿路感染症分離菌における薬剤感受性の検討。金医大誌 2004; 29: 227-34
- 5) 石原 哲, 出口 隆, 篠田育男, 根笹信一, 米田尚生, 林 秀治, 他: 急性単純性膀胱炎に対する cefdinir の有効性および安全性。日化療会誌 2003; 51: 750-7
- 6) 安田 満: 尿路感染症における抗菌薬。内科 2008; 102: 878-83
- 7) 村谷哲郎: 尿路感染症分離菌における抗菌薬に対する耐性状況と耐性化防止の方法について。化療の領域 2009; 25: 29-39
- 8) 甲田雅一, 松島 常, 橋口淳子, 高橋寿久: 尿から分離したフルオロキノロン耐性 *Escherichia coli* に関する調査結果。泌外 2009; 22: 71-7
- 9) OH H, El Amin N, Davies T, Appelbaum P C, Edlund C: *gyrA* mutations associated with quinolone resistance in *Bacteroides fragilis* group strains. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1977-81
- 10) Hirai K, Aoyama H, Suzue S, Irikura T, Iyobe S, Mitsuhashi S: Isolation and characterization of norfloxacin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. Antimicrob Agents Chemother 1986; 30: 248-53

- 11) Ferrero L, Cameron B, Manse B, Lagneaux D, Crouzet J, Famechon A, et al: Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. *Mol Microbiol* 1994; 13: 641-53
- 12) Gotoh N, Tsujimoto H, Poole K, Yamagishi J, Nishino T: The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by *oprK* of the *mexA-mexB-oprK* multidrug resistance operon. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2567-9
- 13) Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby G A: Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351: 797-9
- 14) Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby G A, Macielag M, Abbanat D, Park C H, et al: Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006; 12: 83-8
- 15) 荒明美奈子, 谷真理子, 前橋一紀, 原 哲郎, 渡部宏臣, 高橋 洋, 他: 新経口キノロン系薬 prulifloxacin 活性体 NM394 の type II topoisomerase 遺伝子変異緑膿菌に対する抗菌力。日化療会誌 2003; 51: 132-7
- 16) 石井良和: キノロン耐性の新たなメカニズム。感染症 2006; 36: 24-8

The drug susceptibility of major causative urinary tract infection bacteria, and molecular characterisation of the quinolone resistance-determining regions (QRDR) including *gyrA* and *parC*

Takeshi Ieda¹⁾, Kyoko Kuwahara²⁾, Yuh Morimoto²⁾, Shin-ichi Hisasue¹⁾,
Teruyo Ito²⁾, Shigeo Horie¹⁾ and Keiichi Hiramatsu²⁾

¹⁾ Department of Urology, Juntendo University Faculty of Medicine, 3-1-3 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

²⁾ Department of Bacteriology, Center of Excellence for Infection Control Science, Juntendo University Faculty of Medicine

We examined the drug susceptibilities to the bacteria isolated from urine of the patients suffering from urinary tract infection and their relation with patient's history. The major causative agents were *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*.

The results of susceptibility testing in gram-negative bacteria showed the increase of drug-resistant strains. Especially in *E. coli*, it was showed the increase of Fluoroquinolone (FQL) resistance strains.

To ascertain whether mutations were occurring in the quinolone resistance-determining regions of targets of quinolones, the *gyrA* and *parC* genes, nucleotide sequences of the Quinolone Resistance Determining Region (QRDR) were determined by choosing 46 *E. coli* isolates, the MIC values of which were more than 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The QRDR regions of 46 isolates were classified into 4 types as follows based on the numbers of amino acid substitutions: 8, no substitution; 14, a substitution either in *gyrA* (S83L) or *parC* (S80I); 9, 3 substitutions in *gyrA* (S83L and D87N/S83L and D87G) and *parC* (S80I) or *gyrA* (S83L) and *parC* (S80I and E84V); 15, 4 substitutions in *gyrA* (S83L and D87N) and *parC* (S80I and E84V/S80I or E84G/S80I and E84K). Generally, the MIC values of FQLs increased with the increase of the numbers of amino-acid substitutions, but at the higher MICs, e.g., 64–128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the numbers of substitutions were not always as many as expected.