

【総 説】

薬剤耐性菌の耐性機構に関する研究

—とくに自然耐性機構の解明—

西 野 武 志

京都薬科大学名誉教授・特命教授*

(平成 26 年 1 月 24 日受付・平成 26 年 1 月 31 日受理)

32 年間の京都薬科大学・微生物学教室での研究生生活のなかで、抗菌薬の薬剤耐性菌の耐性機構に関する研究で多くの成果を得ることができました。本稿では報告することができた成果のなかで①マクロライド系薬はなぜ多くのグラム陰性菌に自然耐性なのか？②β-ラクタム系薬をブドウ球菌に作用させた時に観察されるトレラント現象について、③カルバペネム系は緑膿菌に優れた抗菌力を示すが、ペネム系 faropenem はなぜ緑膿菌に抗菌力を示さないのか？についてを概説し、研究室での成果の一端を紹介したいと思います。今回これらの研究で「志賀潔・秦佐八郎賞」を受賞させていただくことになりましたが、日夜努力を継続してくれた教室員に心よりお礼申し上げます。

Key words: macrolides, *M. catarrhalis*, β-lactams, *S. aureus*, intrinsic resistance, *P. aeruginosa*

1972 年から 2004 年までの約 32 年間にわたり京都薬科大学・微生物学教室の職員として研究をする機会に恵まれました。本教室は中澤昭三教授が築かれた研究室であり、中澤教授は京都薬科大学の職員であると同時に東大・伝染病研究所(現在の医科学研究所)でも研究をされ、抗菌薬の基礎研究の代表者の一人として活躍されました。しかし、とても残念なことに 1976 年の 11 月に 47 歳の若さで旅立っていかれ、残された私どもは先生のご遺志に従って先生の研究の方向性を継続することに決めた次第です。その後、京都府立医科大学・微生物学教室の谷野輝雄助教授が 1978 年より 1986 年まで教授として着任されましたが、研究の方向性は変えられませんでした。そして 1987 年 4 月から 2004 年 3 月まで私が教授を務めさせていただきました。私自身は中澤教授の門下生で、大学院博士前期課程で取組んだ「電子顕微鏡を用いた抗菌薬の作用機序の解明」のテーマを中心として「薬剤耐性菌の耐性機構の解明」や「新しい抗菌薬の細菌学的基礎研究」などの領域で研究を続けてきました。その間多くの成果を得ることができ、今回「志賀潔・秦佐八郎賞」を受賞させていただくことになりましたが、努力を継続してくれた教室員の方々に厚くお礼申し上げます。本稿では受賞講演で話した内容を中心に①マクロライド系薬はなぜ多くのグラム陰性菌に自然耐性なのか？②β-ラクタム系薬をブドウ球菌に作用させた時に観察されるトレラント現象について、③カルバペネム系は緑膿菌に優れた抗菌力を示すが、ペネム系 faropenem はなぜ緑膿菌に抗菌力を示さないのか？を概説し、32 年間の微生物学教室での研究の一端を紹介したいと思います。なおキノロン系薬の耐性機構については多くの優れた総説が発表されている

のでここでは省略することにしました。

I. マクロライド系薬はなぜ多くのグラム陰性菌に自然耐性なのか？

マクロライド系薬は細菌細胞の表層を透過して細胞内に到達し、蛋白合成工場であるリボソームの 50S サブユニットに結合し、ペプチド転移反応を阻害する結果、ペプチド鎖の伸長が起らなくなり、蛋白合成が阻害される。このような作用によりマクロライド系は抗菌力を示すが、その作用型式は殺菌的ではなく、主に静菌的な作用であることが知られている。

マクロライド系の抗菌スペクトルは penicillin G (PCG)と同様、ブドウ球菌などのグラム陽性菌に対して非常に優れた抗菌力を示す。またマイコプラズマ、梅毒トレポネーマ、レプトスピラ、リケッチアやクラミジアなどに対しても抗菌力を示す。しかし、モラクセラ(ブランハメラ)¹⁾、インフルエンザ菌やバクテロイデス²⁾などのごく一部のグラム陰性菌を除いては、グラム陰性菌に対して抗菌力を示さない³⁾。私どもはなぜマクロライド系はごく一部のグラム陰性菌に対して抗菌力を示すのかに興味をもち、グラム陰性菌の外膜の構造に焦点をあて、解析を行った。

1. なぜ一部のグラム陰性菌に抗菌力を示すのか？

Table 1 に各種マクロライド系薬のグラム陰性菌に対する抗菌力を示した。緑膿菌 PAO1、大腸菌 AB2847 やサルモネラ TA2167 に対してマクロライド系は抗菌力を示さないが、モラクセラ ATCC25238、インフルエンザ菌 ATCC10211、嫌気性菌のバクテロイデス ATCC25285

*京都府京都市山科区御陵中内町 5

Table 1. MICs of macrolide antibiotics against gram-negative bacteria

Strain	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	EM	CAM	JM	RKM
<i>M. catarrhalis</i> ATCC 25238	0.10	0.10	0.78	0.39
<i>H. influenzae</i> ATCC 10211	3.13	6.25	12.5	12.5
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	0.78	0.39	0.39	0.20
<i>P. aeruginosa</i> PAO 1	>100	>100	>100	>100
<i>E. coli</i> AB 2847	25	25	>100	>100
<i>S. typhimurium</i> TA 2167	>100	>100	>100	>100
<i>S. typhimurium</i> TA 2168	1.56	0.78	25	25

EM, erythromycin; CAM, clarithromycin; JM, josamycin; RKM, rokitamycin;
MIC, minimum inhibitory concentration

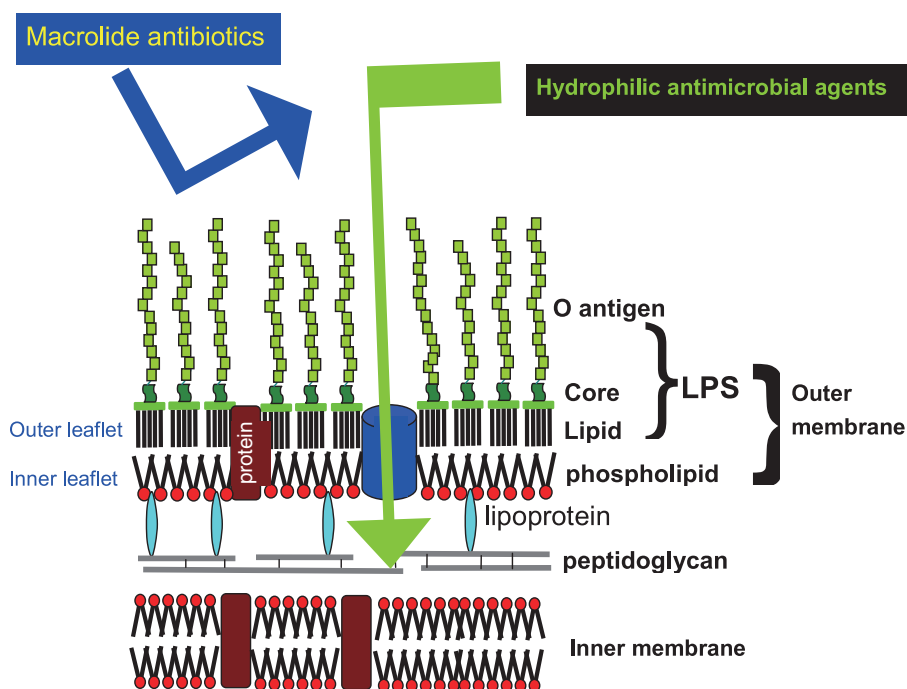


Fig. 1. Schematic model of the cell wall structure of gram-negative bacteria.

やサルモネラ TA2168 に対しては優れた抗菌力を示している。マクロライド系がグラム陰性菌に抗菌力を示さない理由は、外膜に存在するリポ多糖 (lipopolysaccharide : LPS) の O 抗原が親水性であるために、疎水性の高いマクロライド系が通過することができないためと考えられている (Fig. 1)。サルモネラ TA2168 は、TA2167 由来の株で、生化学的、遺伝学的に性状が明らかにされた菌株である。すなわち、TA2168 株は親株の TA2167 (smooth 型) とは異なり、外膜のリポ多糖の O 抗原の糖鎖が短くなったいわゆる deep rough 型で、糖鎖が短くなるとともに外膜の内葉にしか存在しなかったリン脂質が外葉にもみられるようになり、その結果外膜にリン脂質の二重層が形成され、疎水性の高いマクロライド系はここを通過することで抗菌力を示すと考えられる (Fig. 2)^{4,5)}。

したがって、マクロライド系薬が抗菌力を示すグラム

陰性菌は、サルモネラ TA2168 と同じように deep rough 型である可能性が高いと考え以下の検討を行った。

2. 菌体表面の疎水性

外膜にリン脂質の二重層が形成されると、菌体表面が疎水性になることが考えられるので、培養した菌液を n-hexane, n-octane, p-xylene などの溶媒と懸濁し、その移行度 (吸光度により測定) を調べた。その結果、マクロライド系が抗菌力を示さない大腸菌、緑膿菌、サルモネラ TA2167 では溶媒層への移行がほとんどみられなかったが、マクロライド系が抗菌力を示すモラクセラ、インフルエンザ菌、サルモネラ TA2168 やバクテロイデスでは溶媒層に高率に移行しており、菌体の表面が疎水性であることがわかった (Table 2)⁶⁾。

3. 外膜に対する Phospholipase C の作用

Kamio らの方法⁵⁾に従って外膜に存在するリン脂質二重層をあらかじめ放射性物質である ³²P でラベルしてお

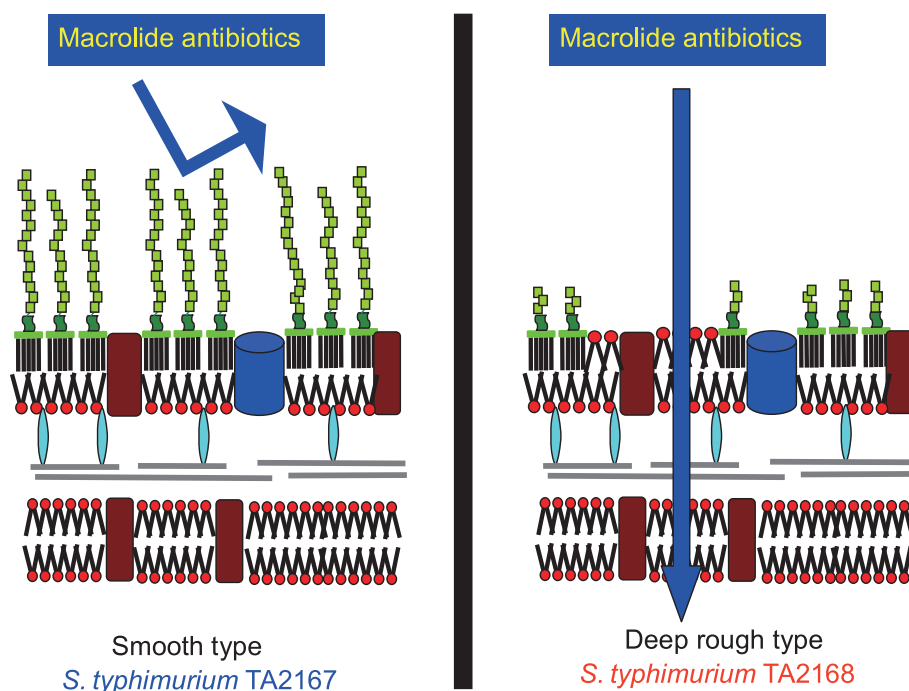


Fig. 2. Schematic model of the cell wall of *S. typhimurium* TA2167 (smooth type) and TA2168 (deep rough type).

Table 2. Affinity of bacterial cells for hydrocarbons

Strain	% Absorbance ^a		
	n-hexane	n-octane	p-xylene
<i>M. catarrhalis</i> ATCC 25238	52	36	29
<i>H. influenzae</i> ATCC 10211	56	61	57
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	71	72	70
<i>P. aeruginosa</i> PAO 1	100	100	96
<i>E. coli</i> AB 2847	97	100	93
<i>S. typhimurium</i> TA 2167	97	97	98
<i>S. typhimurium</i> TA 2168	69	69	68

Each value represents the mean of three determinations, and all SE were less than 10% of the mean.

^aAqueous bacterial suspensions were mixed with 500 μ L of each hydrocarbon and the absorbance of the water phase was measured at 550 nm. Results are expressed as a percentage of the initial absorbance.

き、その後 phospholipase C を作用させると、作用を受けたリン脂質から 32 P が遊離してくるので (Fig. 3)、この遊離量を調べることで外膜が deep rough 型であるかどうか検討した。その結果 Fig. 4 に示すように、マクロライド系が抗菌力を示すモラクセラ、インフルエンザ菌、サルモネラ TA2168 からは phospholipase C の作用により多くの遊離がみられたが、抗菌力を示さない大腸菌、緑膿菌、サルモネラ TA2167 では 32 P の遊離がまったく認められなかった⁷⁾。結果を示していないが、マクロライド系が抗菌力を示す嫌気性のグラム陰性桿菌のバクテロイデスでも同様な結果を得ている。

アミノグリコシド系薬はグラム陰性菌の外膜の LPS に作用し、外膜に障害を与えることが知られている。こ

のような作用を有するので、lysozyme 単独作用ではグラム陰性菌にまったく作用がみられないが、アミノグリコシドと lysozyme を併用した場合、アミノグリコシドにより外膜が障害を受ける結果、lysozyme が外膜を通過することができ、外膜の内側に存在するペプチドグリカン層に作用するために外膜構造が不安定になり、内膜蛋白が遊離してくることが知られている。マクロライド系が抗菌力を示すグラム陰性菌の外膜は deep rough 型と考えられるので、アミノグリコシドはこれらのグラム陰性菌の LPS とほとんど作用できず、したがって lysozyme と併用しても内膜蛋白が遊離しないと推測された。結果を示していないが、マクロライド系が抗菌力を示さない大腸菌やサルモネラ TA2167 では、アミノグリコシドと

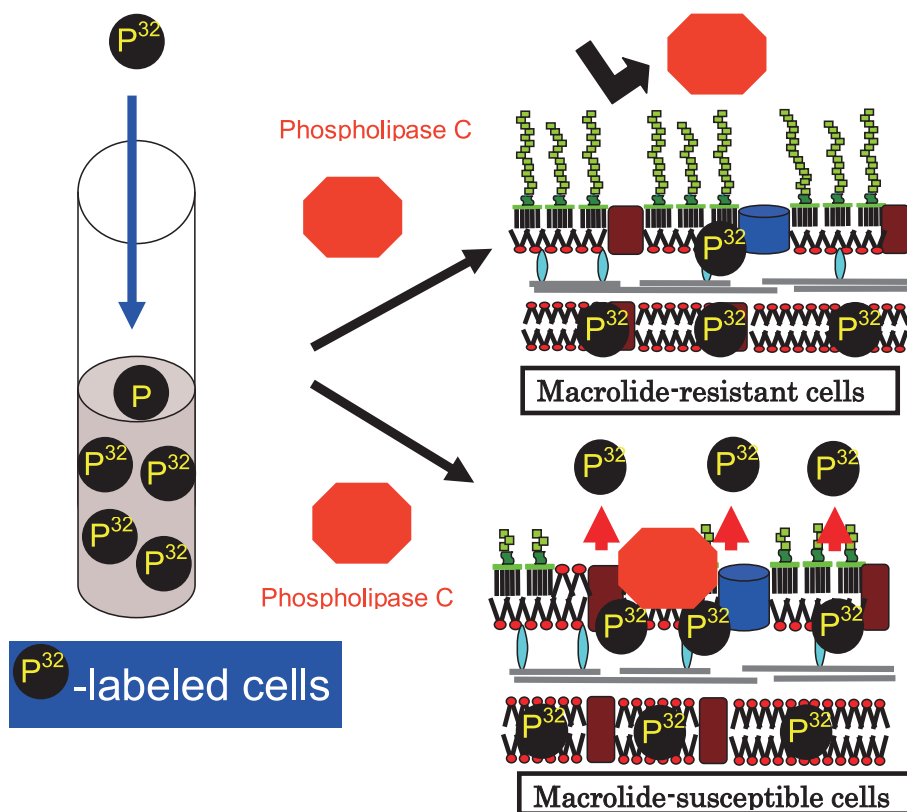


Fig. 3. Schema of the action of phospholipase C on macrolide-susceptible and -resistant cells.

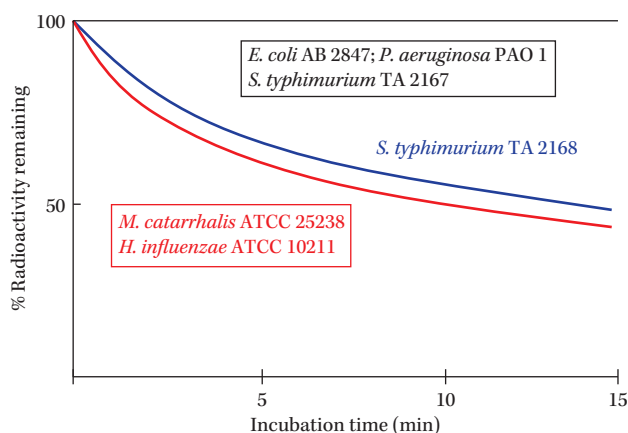


Fig. 4. Release of radiolabeled materials by phospholipase C from whole cells.

lysozyme の併用により内膜蛋白の遊離が観察されたが、マクロライド系が抗菌力を示すモラクセラやサルモネラ TA2168 では、併用により内膜蛋白の遊離がみられなかった。

以上の結果を総合的に考察すると、マクロライド系があるグラム陰性桿菌に抗菌力を示した場合、そのグラム陰性桿菌の外膜構造は deep rough 型であり、外膜の外葉にリン脂質が露出している部分があり、そこをマクロライド系が透過して菌体内に入っていくと考えて良いと思われる。

II. β -ラクタム系薬をブドウ球菌に

作用させた時に観察されるトレラント現象について

β -ラクタム系薬は、細胞壁ペプチドグリカン合成の最終段階で行われるトランスペプチダーゼ反応およびトランスグリコシラーゼ反応を阻害、いわゆるペニシリン結合蛋白 (PBPs) に作用することにより、細胞壁の合成を阻害し細菌を死滅させる。しかし、細胞壁の合成が阻害されただけでは、細菌は死滅しない。すなわち細胞壁の合成を阻害する β -ラクタム系や fosfomycin (FOM) が殺菌的・溶菌的に作用するのは、ブドウ球菌などのグラ

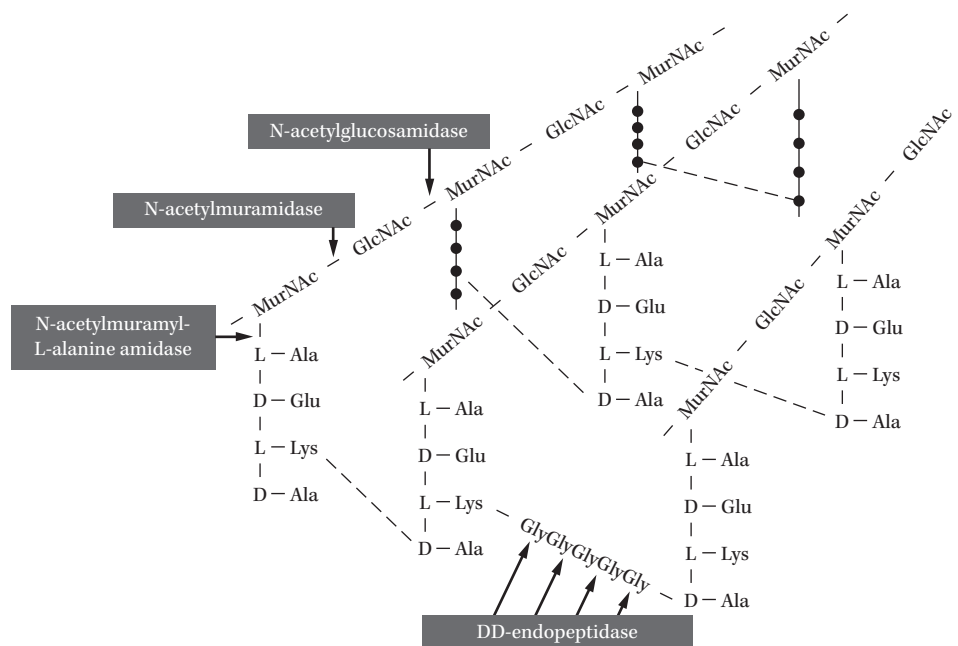


Fig. 5. The site of action of four autolysins in *Staphylococcus aureus*.

ム陽性菌の場合、 β -ラクタム系や FOM が細胞壁の合成を阻害し、一方で細菌自身が保有する自己融解酵素 (autolysin) の阻害剤であるリポタイコ酸 (LTA) が細胞外に遊離されるとともに、自己融解酵素が活性化され、既存の細胞壁のペプチドグリカン層を破壊するからである⁸⁾。

ブドウ球菌などの菌体の内圧は非常に高く、約 20~30 気圧であり、このような高い内圧から破裂しないように自分自身を保護しているのが細胞壁ペプチドグリカン層の大きな役割である。したがって、ペプチドグリカン層の一部が自己融解酵素の働きにより消化され、脆い部分ができると、この部位より菌体の内容物が一挙に流出し、細菌は死滅する。丁度ガスボンベの容器に穴があくと、瞬時にガスが抜けていくのに似ている。このように β -ラクタム系や FOM による殺菌・溶菌過程には必ずこの自己融解酵素の活性化が必要である⁹⁾。

1. ブドウ球菌の自己融解酵素

ブドウ球菌の自己融解酵素 (autolysin, 自己溶菌酵素等とも呼ばれている) としては、酵素学的に N-アセチルムラミダーゼ¹⁰⁾、N-アセチルグルコサミダーゼ^{11,12)}、N-アセチルムラミル-L-アラニンアミダーゼ¹³⁾ およびエンドペプチダーゼの 4 種類が存在することが知られている (Fig. 5)^{14,15)}。自己融解酵素は、細胞壁の成長、分離および細菌細胞の分裂、増殖に必須のもので、新しく合成されてきたペプチドグリカンが既存のペプチドグリカンのなかに組み込まれる時や分裂時に隔壁が分離する時などにも重要な役割を果たしている。一方、自己融解酵素は溶菌・殺菌などに大きな役割を果たしているが、正常な状態では必要に応じて作動するように巧みに調節されてい

ると思われる。

2. 細胞形態学上の 4 種の自己融解系

ブドウ球菌には細胞形態学的に 4 種類の自己融解酵素系が存在することが Giesbrecht ら^{16,17)}により報告されている (Fig. 6)。すなわちその一つは cutting system (切断系) であり、菌の分裂開始時に必須の酵素系である。Splitting system (分離系) は、隔壁形成後、隔壁の分離にとって必須の系であり、これは酵素学的に N-アセチルムラミル-L-アラニンアミダーゼであることが知られている。この酵素の阻害剤として LTA が存在する。この系が阻害されると、ブドウ球菌は分離することができないため、4 連球菌、8 連球菌あるいはパケット状となる。また stripping system (剥離系) は抗菌薬の作用を受けたブドウ球菌が再増殖する場合によく観察される系であり、disintegrating system (崩壊系) は周辺細胞壁などが消化されて行く系で、最終的に細胞壁がすべて消化される¹⁸⁾。

3. β -ラクタム系や FOM の作用を受けたブドウ球菌の溶菌過程

β -ラクタム系をブドウ球菌などのグラム陽性菌に作用させた場合、細胞壁の合成が阻害され、細胞壁ペプチドグリカンの前駆物質である糖ヌクレオチド (UDP-N-acetylmuramyl-pentapeptide) が蓄積する。この蓄積した隔壁形成部位の膨隆は、作用時間の経過とともに自己融解酵素により消化され、この隔壁形成部位よりブドウ球菌は溶菌する (Fig. 7b)。またこの膨隆した最初の隔壁形成部位より 90°C 離れた周辺細胞壁にも溶菌部位が観察される (Fig. 7c)。この部位も隔壁形成部位で、次 (2 番目) に隔壁が形成される所である。また最初に隔壁が

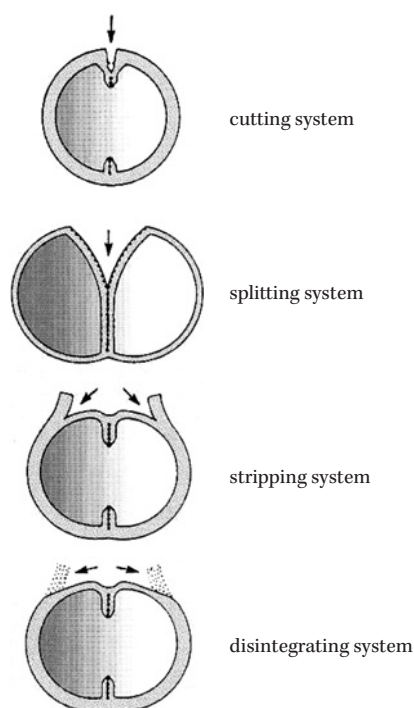


Fig. 6. Schematic representation of the action of four autolytic systems in *Staphylococcus aureus*.

形成されるすぐ横の細胞壁にも溶菌部位が観察されるが (Fig. 7d), この部位も今までに得られた電子顕微鏡の観察結果より, 隔壁形成部位に相当することが判明した。以上の結果より β -ラクタム系の作用を受けたブドウ球菌には3つの溶菌部位が存在し (Fig. 7d left), これらの部位はいずれも隔壁が形成される部位であることがわかった^{19, 20)}。

FOMをブドウ球菌に作用させた場合, 細胞壁合成の初期段階が阻害される結果, 周辺細胞壁が消化され (Fig. 8b), この部位よりブドウ球菌の細胞質内容物が流出し, 細胞質内部が希薄化した溶菌像が観察された (Fig. 8c, d)²¹⁾。これとまったく同じ溶菌像が正常なブドウ球菌をリン酸緩衝液中に懸濁した場合にも観察され, FOMを作用させた場合とリン酸緩衝液中で観察される溶菌の場合は同じ溶菌系が作動しているものと思われる²²⁾。しかし, FOMの作用を受けたブドウ球菌では, β -ラクタム系作用時に観察されたような隔壁の膨化像はまったく観察されず, その溶菌像も β -ラクタム系作用時の隔壁形成部位からの溶菌像とは明らかに異なっていた。すなわち, FOMと β -ラクタム系では溶菌過程において異なった溶菌系が働いている可能性が示唆される。

これらの形態観察の結果からも細胞壁合成阻害抗生物質の作用を受けたブドウ球菌が溶菌・殺菌される過程において自己融解酵素が重要な働きをしていることが明らかである。

4. ブドウ球菌における β -ラクタム系薬の反転現象 (Paradoxical phenomenon; Eagle's effect) について

細菌細胞に抗生物質を作用し, 生菌数測定を行うと, 通常薬剤濃度に対応した殺菌作用, すなわち低濃度より高濃度になるに従って殺菌作用が強くなる。しかし, グラム陽性のブドウ球菌について, β -ラクタム系を用いて同様な実験を行うと, MIC 近辺のある濃度までは濃度に対応した殺菌作用がみられるが, その濃度以上では作用が反転し, 殺菌作用が減弱することが知られている。このような知見については, 1948年 Eagleらはブドウ球菌, レンサ球菌, 肺炎球菌などのグラム陽性菌を用いて, PCGの殺菌作用はMIC以上のある濃度において頭打ちもしくは殺菌作用が反転あるいは減弱する現象を観察し, このような現象を Eagle's effect (paradoxically reduced activity; paradoxical phenomenon) として報告している²³⁾。当時使用されていたPCG製剤に含有されている不純物が原因でこのような作用がみられる可能性もあり, その後なぜこのような作用がみられるのかほとんど検討されなかった。そこで私どもは β -ラクタム系を黄色ブドウ球菌に作用させた場合に観察される反転現象について主に形態学的な見地から解析を行った²⁴⁾。

1) 殺菌作用

大腸菌や緑膿菌などのグラム陰性桿菌に β -ラクタム系のMIC近辺の濃度から高濃度までを作用し, 生菌数を測定すると, 低濃度より高濃度になるに従って著明な殺菌作用がみられる。しかし, グラム陽性の黄色ブドウ球菌209-Pについて, β -ラクタム系のcephalothin (CET)を用いて同様な実験を行うと, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2 MIC) で最も強い溶菌作用が観察され, 1, 5, 10, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と高濃度になるに従って溶菌作用が減弱することがわかった (Fig. 9)。この時同時に生菌数の変化も観察したが, 同様に0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用で最も強い殺菌作用がみられ, 高濃度になるに従って殺菌作用も減弱した。また, 209-P以外の臨床分離の黄色ブドウ球菌4株について検討を行ったが, すべての株で同様な現象が観察され, ブドウ球菌などのグラム陽性菌で普遍的に観察される現象であることがわかった。さらに, 他の β -ラクタム系cephaloridine, cefazolin, cephalixin (CEX), sulbenicillin, carbenicillin, mecillinamでも同様な反転現象が観察された。

2) 位相差顕微鏡や走査型電子顕微鏡による形態観察

黄色ブドウ球菌で観察される β -ラクタム系のCEXによる反転現象時の形態変化を, 先ず位相差顕微鏡で観察した。観察する視野を変え, それぞれの濃度の4時間作用時の100個の細胞あたりの溶菌率を求めたところ, 低濃度の0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で最も多くの溶菌像がみられ, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の高濃度では0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用よりも溶菌した細胞がきわめて少ないことがわかった。

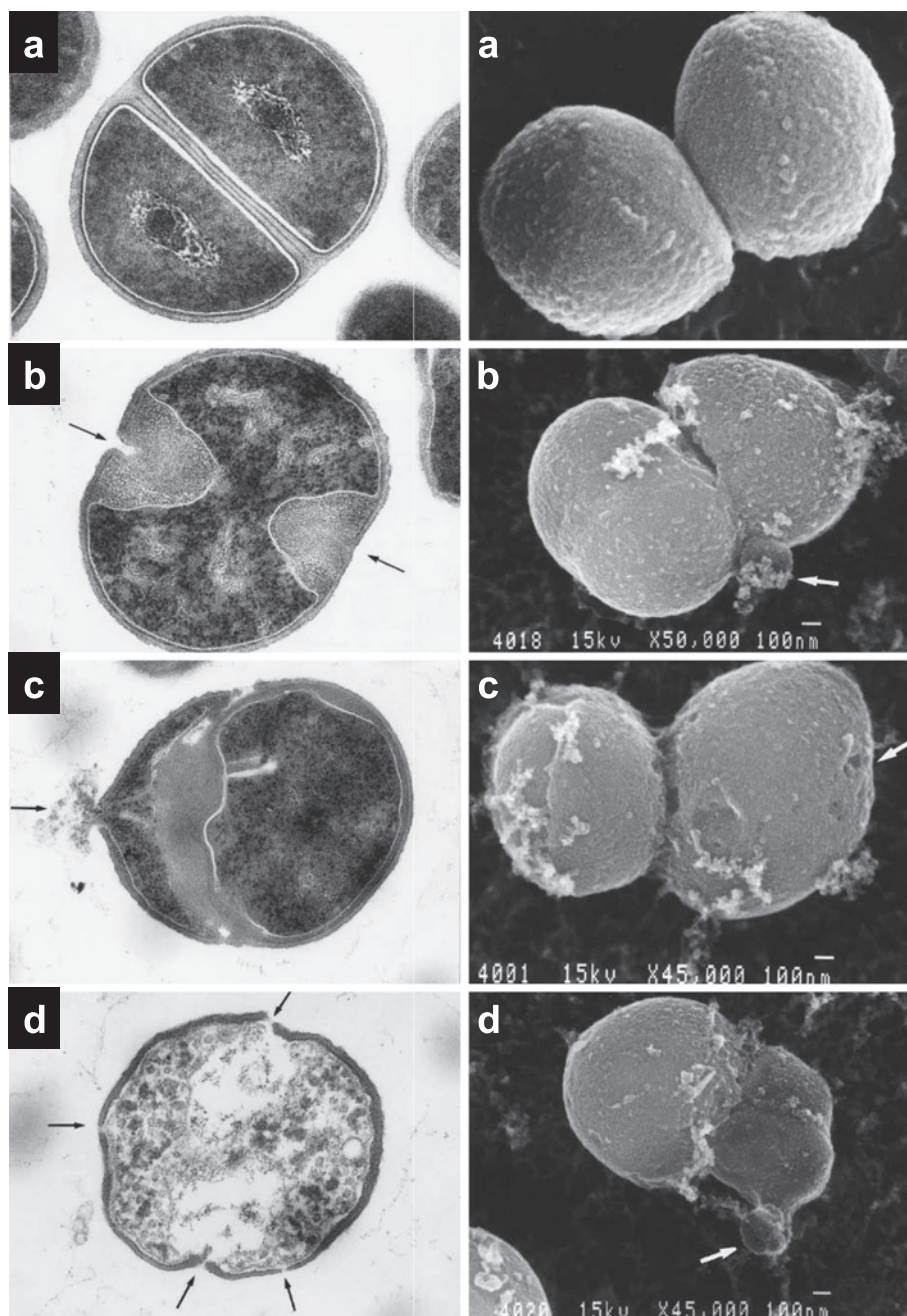


Fig. 7. Transmission (left) and scanning (right) electron micrographs of *S. aureus* 209-P JC cells treated with cefotiam (CTM).

a: Normal *S. aureus* cells. The lytic sites at the first division plane (b) and swollen septum (b) are observed (arrowed). Another lytic sites about 90 degree away from (c) and near (d-right) the first division plane are also observed. Finally at least three lytic sites on the cell wall (d-left) could be observed after treatment with CTM.

次に走査型電子顕微鏡により観察を行った。CEXの0.5および800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を黄色ブドウ球菌209-Pに4時間作用させた時の走査電顕像をFig. 10に示した。正常なブドウ球菌では表面構造はsmoothであり(Fig. 10a), 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用では多くの溶菌像が観察されたが(Fig. 10b), 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の高濃度作用ではほとんど溶菌像は観察されなかった(Fig. 10c)。図には示していない

が、CETの低濃度、高濃度作用でも同様な結果であった。また、これらの観察結果は位相差顕微鏡での観察結果を裏付けるものであった。

3) 透過型電子顕微鏡による観察

私どもはCET, CEX, CTM, imipenem (IPM)を黄色ブドウ球菌209-Pに作用させた時に観察される反転現象時の内部構造の変化を観察した。Fig. 11はCTM作用

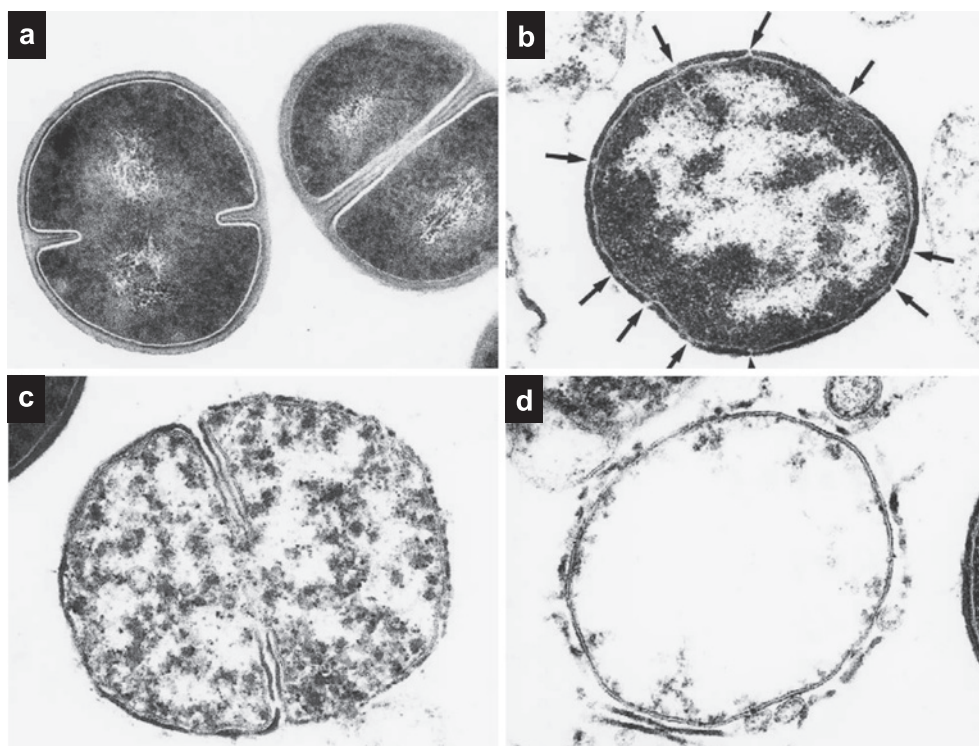


Fig. 8. Ultrathin sections of *S. aureus* 209-P cells exposed to FOM. a; Normal *S. aureus* cells. b-d; The lytic sites in the peripheral cell wall of *S. aureus* cells treated with FOM are observed (arrowed).

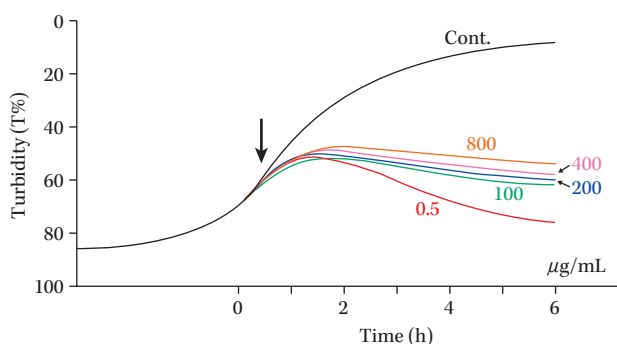


Fig. 9. Effect of various concentrations of CET on the growth curve of *S. aureus* 209-P.

4時間後の像で、 $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ の低濃度作用では多くの溶菌像が観察される (Fig. 11a)。すなわち、CTMの作用により細胞壁の合成が阻害される結果、隔壁部分に膨隆(細胞壁ペプチドグリカンの前駆物質の蓄積)が起り、一方で自己融解酵素で細胞壁が消化され、隔壁部分からの溶菌が観察される (Fig. 11a, b)。しかし、CTMの $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 作用では、溶菌像はほとんど観察されない (Fig. 11c)が、CTMの本来の作用である細胞壁合成阻害作用は、隔壁形成部位に膨隆像として観察される (Fig. 11c, d)。実際、放射性物質 ^{14}C -L-lysineなどを用いて調べると、低濃度よりも高濃度のほうが、より強い細胞壁合成阻害作用を示す。CET, CEXやIPM作用時にもまった

く同様な結果を得ている。

4) 反転現象の機構

細胞壁の合成を β -ラクタム薬で阻害されたブドウ球菌は、細胞壁の合成を阻害されただけでは溶菌・殺菌されず、溶菌・殺菌されるためには菌自身が保有する自己融解酵素の働き (Fig. 5)により既存の細胞壁が消化されることが必要である。これらのことを総合的に考察すると、ブドウ球菌などのグラム陽性菌で観察される β -ラクタム薬の反転現象は、 β -ラクタム薬の高濃度作用のほうが細胞壁合成に対してより強い阻害を示すにもかかわらず、低濃度作用よりも浸透圧に脆い細胞プロトプラストが形成されにくいという事実から、高濃度作用により自己融解酵素が何らかの影響を受けたために溶菌および殺菌が阻害されたことによるものと推測される。事実、自己融解酵素の一つであるムラミダーゼ活性がpenicillinの高濃度や細胞壁ペプチドグリカンの成分であるN-acetylglucosamineにより阻害されることが報告されている。また、Hartmannらは、penicillinの大腸菌への作用部位は細胞壁合成酵素transpeptidaseだけでなく、自己融解酵素にも作用するという興味ある結果を報告している。なぜ β -ラクタム薬が自己融解酵素を阻害するかについては、penicillinの構造が細胞壁ペプチドグリカンの構成成分であるN-acetylmuramic acidに類似しているために、自己融解酵素のムラミダーゼがpenicillinと反応することによるものと推察される^{25, 26)}。

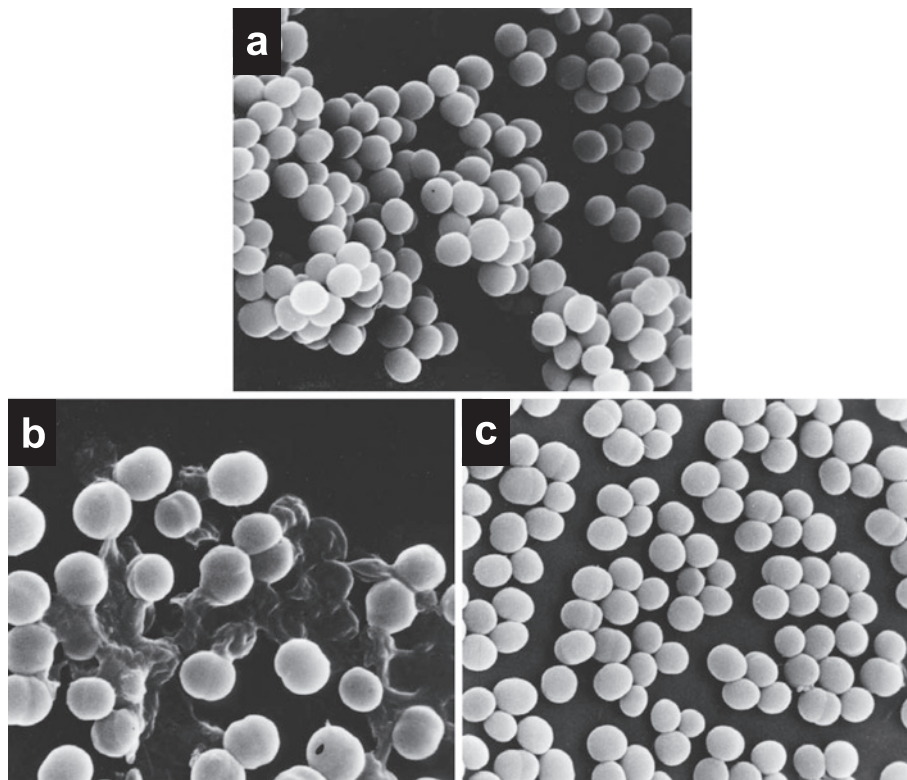


Fig. 10. Scanning electron micrographs of *S. aureus* 209-P JC cells treated with CEX. a; Untreated *S. aureus* cells. b; Cells after 4 h of exposure to 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CEX. Many lysed cells are seen. c; Cells after 4 h of exposure to 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CEX. Cellular lysis is not observed.

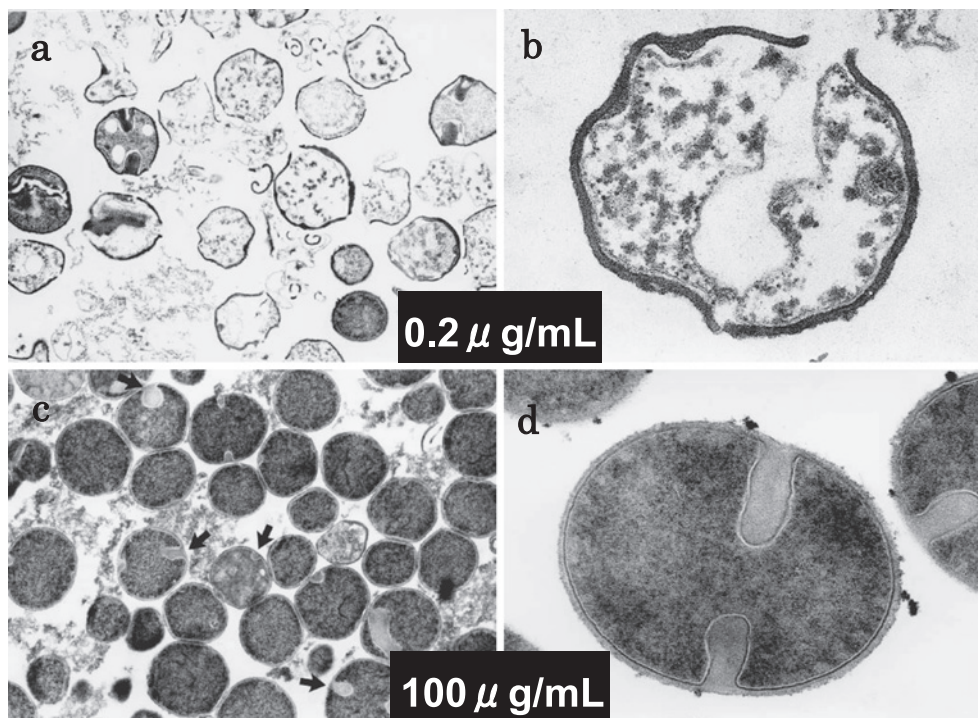


Fig. 11. Transmission electron micrographs of *S. aureus* 209-P JC cells after 4 h of exposure to CTM. a, b; Cells after 4 h of exposure to 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CTM. Many spheroplast-like structures and lysed cells are observed. c, d; Cells after 4 h of exposure to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CTM. Retention of the cell wall is seen in almost all cells, and only some cells are lysed. Swelling of cell wall septum (d) is observed.

5. 自己融解酵素に対する阻害剤の作用

ブドウ球菌の細胞壁には自己融解酵素の阻害剤であるリポタイコ酸 (lipoteichoic acid; LTA) が存在する。自己融解酵素はブドウ球菌の分裂・増殖に必要な酵素であ

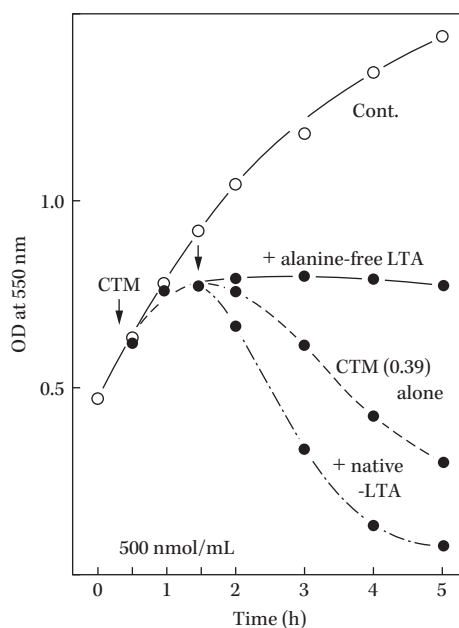


Fig. 12. Effect of native-lipoteichoic acid (LTA) and alanine-free LTA on the growth curve of *S. aureus* 209-P JC treated with CTM.

り、一方で細胞壁ペプチドグリカンに作用し、消化するので自己溶菌 (autolysis) の原因となるが、正常時にはむやみに働かないように LTA が調節していると考えられる²⁷⁻²⁹。また polyanetholsulfonic acid (PA) や heparin などのアニオン性物質は自己融解酵素を阻害し^{30, 31}、RNase や lysozyme などのカチオン性物質は自己融解酵素を活性化することが知られている。

1) β -ラクタム系作用時のブドウ球菌の溶菌・殺菌に及ぼす自己融解酵素阻害剤の影響

ブドウ球菌から LTA を抽出、精製し、この native-LTA から D-alanine を取り除いた alanine-free LTA を作成した^{32, 33}。そして β -ラクタム系の CTM をブドウ球菌に作用させた時に観察される溶菌・殺菌過程に alanine-free LTA, native-LTA やアニオン性物質の PA がどのような影響を及ぼすかを CTM 作用 1 時間後にこれらの物質を作用させ実験を行ったところ、CTM による溶菌が alanine-free LTA や PA により完全に阻害されることがわかった (Fig. 12)。一方、alanine を含有する native-LTA はむしろ CTM による溶菌を促進することがわかった。

内部構造の変化を透過型電子顕微鏡により観察したところ (Fig. 13), CTM の作用を受けたブドウ球菌は細胞壁の合成が阻害され、隔壁部位が著しく膨隆し、この膨隆部位から溶菌していく像が観察された (Fig. 13b)。一方、alanine-free LTA やアニオン性物質の PA を併用

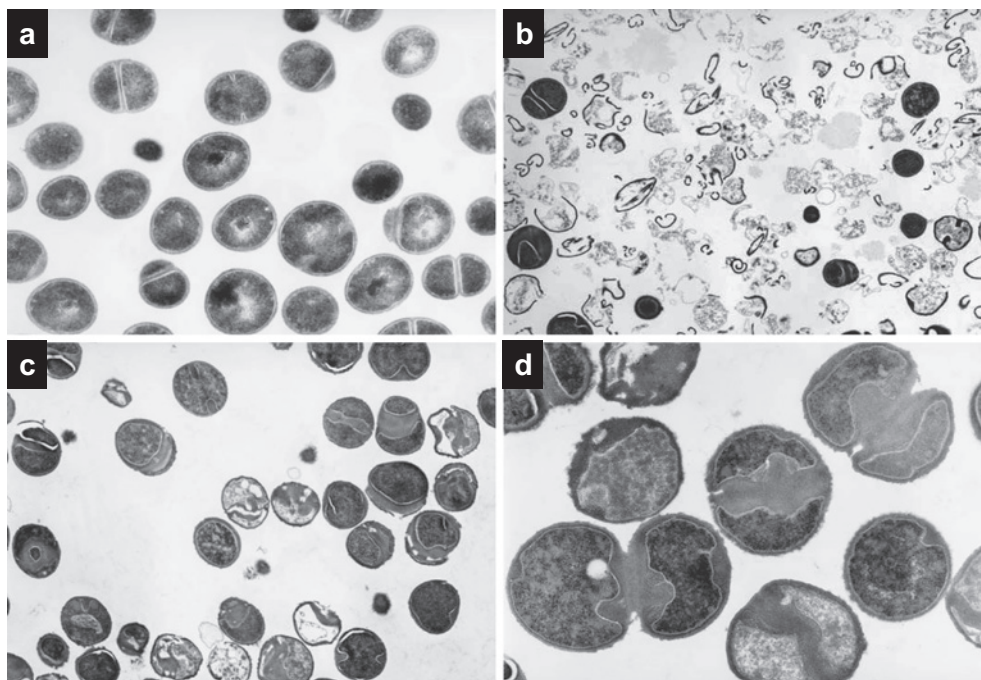


Fig. 13. Transmission electron micrographs of *S. aureus* 209-P JC cells after 4 h of exposure to the combination of CTM and alanine-free lipoteichoic acid (LTA). a; Untreated *S. aureus* 209-P cells. b; Cells after 4 h of exposure to CTM. Many lysed cells are observed. c, d; Cells after 4 h of exposure to the combination of CTM and alanine-free LTA. Only some cells are lysed. Many cells are observed with swelling of the cross wall.

Table 3. *In vitro* antimicrobial activities of faropenem and other β -lactam antibiotics

Organism	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	Faropenem	Amoxicillin	Cefaclor	Cefixime
<i>S. aureus</i> 209P JC-1	0.1	0.1	0.78	100
<i>S. pyogenes</i> S-23	≤ 0.025	≤ 0.025	0.2	0.2
<i>S. pneumoniae</i> Type I	≤ 0.025	≤ 0.025	1.56	0.2
<i>E. coli</i> K-12	0.78	3.13	0.78	0.39
<i>K. pneumoniae</i> KC-1	0.78	1.56	0.78	0.2
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	>100	>100	>100	100

した場合、CTMの作用による隔壁部位の膨隆像はみられるが、隔壁部位からの溶菌は阻害されていた (Fig. 13c, d)。以上の結果からも β -ラクタム系で細胞壁が阻害されただけではブドウ球菌は溶菌・殺菌されず、菌自身が保有する自己融解酵素の働きが溶菌・殺菌に必要であり、LTAがその阻害剤として自己融解酵素の働きを微妙に調節していることが示唆される^{34, 35)}。

またグラム陽性菌、特にブドウ球菌に β -ラクタム系とマクロライド系などのタンパク合成抗生物質を併用した場合に β -ラクタムによる殺菌作用が阻害を受ける、いわゆる拮抗現象がみられることが古くより知られているが^{36, 37)}、これもタンパク合成阻害抗生物質により自己融解酵素が阻害を受けるために発現すると考えられている³⁸⁾。

III. ペネム系 Faropenem はなぜ緑膿菌に抗菌力を示さないのか？

ペネム系薬の faropenem (FRPM) はグラム陽性菌や多くのグラム陰性菌に対して優れた抗菌力を示すが、緑膿菌に対してはほとんど抗菌力を示さない (Table 3)³⁹⁾。カルバペネム系薬の IPM, panipenem, meropenem, biapenem, doripenem などは緑膿菌に対して優れた抗菌力を示すが、なぜペネム系は緑膿菌に対して抗菌力を示さないのかを明らかにするために以下の検討を行った。一般的に β -ラクタム系薬のグラム陰性菌に対する抗菌力は、①外膜の透過性、②排出システム、③ β -lactamase に対する安定性、④標的部位であるペニシリン結合タンパク質 (PBPs) に対する親和性、これら4つの因子により影響を受けることが知られているので、これら4つの因子の解析を行った。

1. 外膜の透過障壁について

グラム陰性菌の細胞壁固有の外膜は物質の透過障壁として働くため、耐性機構の一つになっている。特に緑膿菌の D2 ポーリンはカルバペネムやアミノ酸の特異的な透過孔で、その分子量排除限界が低いことが知られている。この外膜透過障壁を緩和させるために、大腸菌外膜の主要なポーリンタンパク質 OmpF を遺伝学的手法を用いて緑膿菌に産生させた。OmpF の産生はペネム系の FRPM および sulopenem の外膜透過率をそれぞれ

1.8 倍および 5.1 倍上昇させ、FRPM や ritipenem などに対する感受性を 16~32 倍、sulopenem に対する感受性を 128 倍上昇させた。これは OmpF 孔が1つの陰性荷電をもつ FRPM より2つの陰性荷電と1つの陽性荷電をもつ sulopenem の透過に選択性が高いことを反映した結果と言える。このように OmpF 孔は緑膿菌のペネム系に対する感受性を上昇させたが、大腸菌のペネム系に対する感受性ほどまでは上昇させなかった。

2. 排出システム MexAB-OprM の影響について

緑膿菌の野生株でもわずかに産生している排出システム MexAB-OprM の関与について調べるために、緑膿菌 PAO1 株から *mexA* 破壊株を作成した。そしてそれらの感受性を調べたところ、MexAB-OprM システムの破壊はペネム系に対する感受性を 2~64 倍上昇させ、別途検討した MexAB-OprM の過剰産生株 (OCR1) はペネム系に対する感受性を 1/4~1/8 に低下させたことから、MexAB-OprM が緑膿菌のペネム系に対する自然耐性の要因の一つであることが示された。

緑膿菌の染色体上には RND 型マルチコンポーネント排出システムが約 10 種類存在することが示唆されているが、既知の排出システムである MexAB-OprM, MexCD-OprJ および MexXY-OprM の単独産生株のペネム系に対する感受性を調べたところ、ペネム系に対する排出活性の高い順に MexAB-OprM > MexCD-OprJ > MexXY-OprM であることが示唆された⁴⁰⁾。

3. 薬剤分解酵素 β -lactamase の関与について

ペネム系は緑膿菌由来の β -lactamase を含む多くの β -lactamase に対して高い安定性を示したことから、緑膿菌のペネム系の自然耐性に AmpC β -lactamase は関与しないと考えられた。事実、緑膿菌 PAO1 株の *ampC* を破壊してもペネム系に対する感受性はほとんど変らなかった。しかし、*ampC* 破壊が排出システムの MexAB-OprM の破壊と重なることでペネム系に対する感受性は 64~512 倍上昇した。

この結果は AmpC β -lactamase も緑膿菌のペネム系に対する自然耐性要因の一つであることを示しているが、ペネム系が緑膿菌由来の β -lactamase による加水分解に抵抗性を示すという報告と矛盾する。そこで、AmpC

Table 4. Susceptibilities of *P. aeruginosa* PAO1 and its isogenic mutants to penem antibiotics

	Phenotype ^b			MIC ($\mu\text{g/mL}$) ^a				
	OmpF	MexAB	AmpC	Faropenem	Ritipenem	AMA3176	Sulopenem	Sch29482
PAO1	-	+	+	512	128	128	32	256
PAO1/pKMF010	+	+	+	32	8	8	0.25	8
KG2225	-	-	+	32	64	8	4	4
KG2225/pKMF010	+	-	+	2	4	1	0.125	1
KG2504	-	+	-	256	32	64	16	128
KG2504/pKMF010	+	+	-	32	4	16	0.25	8
KG2505	-	-	-	1	2	0.5	0.125	1
KG2505/pKMF010	+	-	-	0.5	2	0.5	0.06	0.5
<i>E. coli</i> (MIC ₉₀)				2	1	0.5	0.063	1

^a MICs were determined in experiments with L-agar containing 1 mM IPTG. The presence of pKMF012 (vector control) alone in the tested strains did not change the susceptibility to any agent in this table.

^b +, wild-type level; -, non-expression

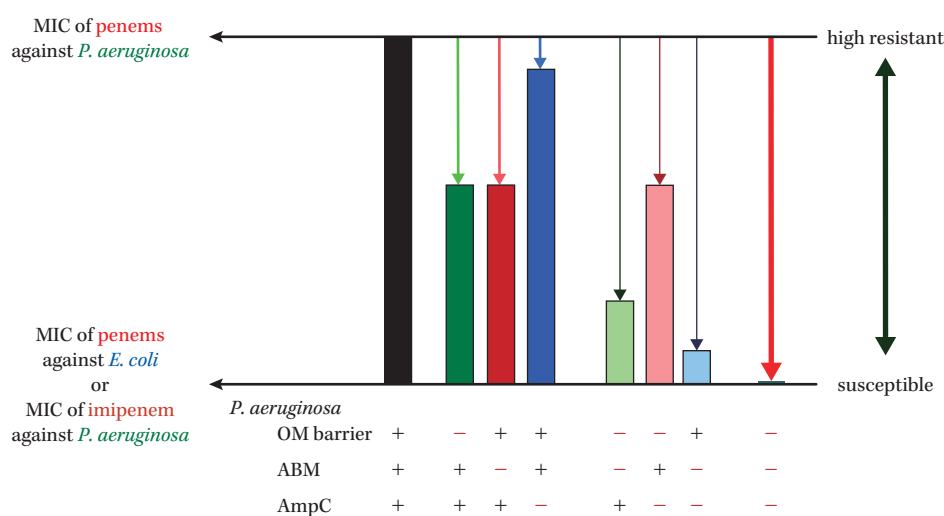


Fig. 14. Model representing the relationship between the MIC and the inhibition of the outer membrane barrier, MexAB-OprM or AmpC β -lactamase.

β -lactamase と作用させた後のペネム系の残存活性を経時的にバイオアッセイで測定したところ、ペネム系は時間の経過とともに分解されることが明らかになった。

4. 標的酵素 PBP_s に対する親和性

緑膿菌の PBP_s に対する結合親和性の検討では、FRPM の PBP1b および PBP2 に対する 50% 阻害濃度 IC₅₀ は IPM と大きな差は認められず、1.5~1.8 倍とわずかに高い値であった。また、OmpF の発現、MexAB-OprM および AmpC β -lactamase の欠失が重なった場合の FRPM と IPM の感受性が同じであったことは、PBP_s に対する結合親和性が緑膿菌のペネム系の自然耐性の主要な原因とはならないことを示唆している。

5. 複数の要因の関与

以上の結果は外膜透過障壁、排出システムおよび AmpC β -lactamase が緑膿菌のペネム系の自然耐性の原因であることを示しているが、いずれも単独の機構だけでは緑膿菌のペネム系の自然耐性を説明するには不十分

であるので、これらの要因の重複による感受性の変化を検討した (Table 4)。

緑膿菌のペネム系に対する感受性は AmpC β -lactamase の欠失と MexAB-OprM の欠失が重なることで 64~512 倍、MexAB-OprM 欠失と OmpF 発現が重なることで 32~256 倍上昇した。さらに、MexAB-OprM の欠失、AmpC β -lactamase の欠失および OmpF 発現の 3 つが重なった場合に最もペネム系に対する感受性が上昇し、ほとんどのペネム系に対する感受性が AmpC β -lactamase を欠失させた緑膿菌の IPM に対する感受性あるいは大腸菌のペネム系に対する感受性と同じになった (Fig. 14)。

以上の結果は緑膿菌のペネム系に対する自然耐性は外膜透過障壁、排出システムおよび AmpC β -lactamase が協力して引き起こしていることを示している⁴¹⁾。

IV. 終わりに

細菌学や抗生物質の領域で電子顕微鏡を一つの武器と

して研究を継続してきましたが、その電子顕微鏡も使用する人がいないとの理由で廃棄処分されてしまいました。医学部や他の大学でも同じような傾向であるようです。私の知っている限り、日本ではこの領域で電子顕微鏡を扱っている研究者は激減しており、今やほんの一握りの研究者が活躍されているにすぎません。電子顕微鏡を用いた生物系の技術の進歩が遺伝学に比べて遅いことや実験結果を得るまでに時間がかかり、かなりの忍耐力が必要であることにもその理由があるように思います。しかし遺伝子やタンパク質の立体構造も観察することが可能になってきており、次の若い世代のなかから形態学に興味をもってくれる研究者が育ってくれることを期待しています。

また日本における抗菌薬の開発研究が低下してきており、多くの製薬会社の研究所が方向転換をしてきました。しかし感染症は医療現場で決して減少しているのではなく、今後も耐性菌が問題になってくる可能性が高いと思われる。抗菌薬や抗ウイルス薬を使用していれば、その使用量が多くなれば当然耐性細胞が出現し、治療に困る事態になることが予想されます。それ故今までは作用機序の異なった薬を開発しておくことが非常に重要であると考えられます。幸い本学会に館田先生を委員長とする創薬促進検討委員会が立ち上げられましたので、画期的な新たな抗菌薬が世の中に出てくることを夢見ています。

謝 辞

本論文は平成 24 年度志賀潔・秦佐八郎記念賞を教室を代表して受賞した研究内容の一部を総説にまとめたもので、心より感謝申し上げます。また本研究を遂行するにあたり、京都薬科大学・微生物学教室で研究の機会を与えていただいた故 中澤昭三教授、故 谷野輝雄教授および日夜研究に没頭し、ご協力いただいた後藤直正教授、大槻雅子准教授、辻元秀人助手をはじめとする教員、田中真由美、岡本清美をはじめとする研究生、大学院生の皆さんに衷心より厚くお礼を申し上げます。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文 献

- Doern G V, Tubert T A: In vitro activities of 39 antimicrobial agents for *Branhamella catarrhalis* and comparison of results with different quantitative susceptibility test methods. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 259-61
- Kobayashi Y, Kanazawa K, Nishino T: Transmembrane diffusion of hydrophobic antimicrobial agents and cell surface hydrophobicity in *Bacteroides fragilis*. *FEMS Microbiol Lett* 1991; 81: 141-4
- Leclercq R, Courvalin P: Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1273-6
- Ames G F, Spudich E N, Nikaido H: Protein composition of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*: effect of lipopolysaccharide mutants. *J Bacteriol* 1974; 117: 406-16
- Kamio Y, Nikaido H: Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase C and cyanogen-bromide-activated dextran in the external medium. *Biochemistry* 1976; 15: 2561-70
- Gotoh N, Tanaka S, Nishino T: Susceptibility to hydrophobic antimicrobial agents and cell surface hydrophobicity in *Branhamella catarrhalis*. *FEMS Microbiol Lett* 1989; 59: 211-4
- Tsujimoto H, Gotoh N, Nishino T: Diffusion of macrolide antibiotics through the outer membrane of *Moraxella catarrhalis*. *J Infect Chemother* 1999; 5: 196-200
- Tomasz A, Waks S: Mechanisms of action of penicillin: triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 4162-6
- Tomasz A, Albino A, Zanati E: Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. *Nature* 1970; 227: 138-40
- Huff E, Silverman C S, Adams N J, Awkard W S: Extracellular cell wall lytic enzyme from *Staphylococcus aureus*: purification and partial characterization. *J Bacteriol* 1970; 103: 761-9
- Wadström T, Hisatsune K: Bacteriolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*. Purification of an endo- β -N-acetylglucosaminidase. *Biochem J* 1970; 120: 725-34
- Sugai M, Koike H, Hong Y M, Miyake Y, Nogami R, Suginaka H: Purification of a 51 kDa endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1989; 52: 267-72
- Singer H J, Wise E M, Park J T: Properties and purification of N-acetylmuramyl-L-alanine amidase from *Staphylococcus aureus* H. *J Bacteriol* 1972; 112: 932-9
- Valisena S, Varaldo P E, Satta G: Purification and characterization of three separate bacteriolytic enzymes excreted by *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans* and *Staphylococcus saprophyticus*. *J Bacteriol* 1982; 151: 636-47
- Jayaswal R K, Lee Y I, Wilkinson B J: Cloning and expression of a *Staphylococcus aureus* gene encoding a peptidoglycan hydrolase activity. *J Bacteriol* 1990; 172: 5783-8
- Giesbrecht P, Wecke J, Reinicke B: On the morphogenesis of the cell wall of staphylococci. *Int Rev Cytol* 1976; 44: 225-318
- Giesbrecht P, Wecke J: On the structure and function of autolytic wall systems in gram-positive bacteria. *Proc 7th Eur Congr Electron Microsc. The Hague* 1980; 2: 446-53
- 西野武志：黄色ブドウ球菌における自己融解酵素の作用の電顕的観察。 *Current Concepts in Infectious Diseases* 1993; 12: 6-9
- Nishino T, Otsuki M: Morphological response of *Staphylococcus aureus* to β -lactams. In Umezawa H (ed.), *Frontiers of antibiotic research*, Academic Press, Tokyo, 1987; 55-68

- 20) 西野武志：抗菌薬の作用部位の電子顕微鏡的観察。感染・炎症・免疫 1999; 29: 111-20
- 21) 西野武志：抗菌薬による細菌消長時の超微細形態。総合臨床 1993; 42: 253-9
- 22) 西野武志：第2章ホスホマイシンの基礎 2-4 形態変化。清水喜八郎 監修, ホスホマイシン—新たなる展開一, 臨床医薬研究協会, 1995; 34-41
- 23) Eagle H, Musselman A D: The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. J Exp Med 1948; 86: 99-131
- 24) Nishino T, Nakazawa S: Bacteriological study on effects of β -lactam group antibiotics in high concentrations. Antimicrob Agents Chemother 1976; 9: 1033-42
- 25) Blumberg P M, Strominger J L: Isolation by covalent affinity chromatography of the penicillin-binding components from membranes of *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci U S A 1972; 69: 3751-5
- 26) 田中信男：抗生物質と病原微生物。薬局 1977; 28: 19-28
- 27) Cleveland R F, Holtje J V, Wicken A J, Tomasz A, Daneo-Moore L, Shockman G D: Inhibition of bacterial wall lysins by lipoteichoic acids and related compounds. Biochem Biophys Res Commun 1975; 67: 1128-35
- 28) Hölz J V, Tomasz A: Lipoteichoic acid: a specific inhibitor of autolysin activity in *Pneumococcus*. Proc Natl Acad Sci U S A 1975; 72: 1690-4
- 29) Suginaka H, Shimatani M, Ogawa M, Kotani S: Prevention of penicillin-induced lysis of *Staphylococcus aureus* by cellular lipoteichoic acid. J Antibiot 1979; 32: 73-7
- 30) Wecke J, Kwa E, Lahav M, Ginsburg I, Giesbrecht P: Suppression of penicillin-induced bacteriolysis of staphylococci by some anticoagulants. J Antimicrob Chemother 1987; 20: 47-55
- 31) Wecke J, Lahav M, Ginsburg I, Kwa E, Giesbrecht P: Inhibition of wall autolysis of staphylococci by sodium polyanethole sulfonate "liquoid". Arch Microbiol 1986; 144: 110-5
- 32) Fischer W, Koch H U, Hass R: Improved preparation of lipoteichoic acids. Eur J Biochem 1983; 133: 523-30
- 33) Koch H U, Docker R, Fischer W: Maintenance of D-alanine ester substitution of lipoteichoic acid by re-esterification in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1985; 164: 1211-7
- 34) Tomasz A, Waks S: Mechanism of action of penicillin: triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 1975; 72: 4162-6
- 35) 嶋谷雅博：黄色ブドウ球菌の自己融解のリポタイコ酸による調節とペニシリンによる殺菌。I. 自己融解の調節因子としてのリポタイコ酸の役割。阪大歯学誌 1979; 24: 54-67
- 36) Jawetz E, Gunnison J B, Speck R S, Coleman V R: Studies on antibiotic synergism and antagonism. The interference of chloramphenicol with the action of penicillin. AMA Arch Intern Med 1951; 87: 349-59
- 37) Mathies A W, Leedom J M, Ivler D, Wehrle P F, Portnoy B: Antibiotic antagonism in bacterial meningitis. Antimicrob Agents Chemother 1968; 1967: 218-24
- 38) Nishino T: An electron microscopic study of antagonism between cephalixin and erythromycin in *Staphylococcus aureus*. Jpn J Microbiol 1975; 19: 53-63
- 39) Nishino T, Maeda Y, Ohtsu E, Koizuka S, Nishihara T, Adachi H, et al: Studies on penem antibiotics. II. In vitro activity of SUN5555, a new oral penem. J Antibiot (Tokyo) 1989; 42: 977-88
- 40) Okamoto K, Gotoh N, Nishino T: Extrusion of penem antibiotics by multicomponent efflux systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 2696-9
- 41) Okamoto K, Gotoh N, Nishino T: *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1964-71

Studies on the mechanisms of antimicrobial resistance

—Elucidation of the natural resistance mechanism in bacteria—

Takeshi Nishino

Kyoto Pharmaceutical University, 5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto, Japan

In my life of study for about 32 years in the Department of Microbiology at Kyoto Pharmaceutical University, I was able to obtain a great deal of data on the resistant mechanism of antimicrobial-resistant bacteria. In this review, I would like to explain about some of the experimental results of the following studies, ①Most gram-negative bacteria are resistant to macrolide antibiotics, but some gram-negative bacteria such as *Moraxella catarrhalis* and *Haemophilus influenzae* exhibit hyper-susceptibility to macrolides. Why are macrolides so active against some gram-negative bacteria? ②Regarding the tolerant phenomenon observed with *Staphylococcus aureus* treated with β -lactam antibiotics. ③*Pseudomonas aeruginosa* shows high susceptibility to carbapenem antibiotics such as imipenem, meropenem and doripenem, but *P. aeruginosa* exhibits high intrinsic resistance to penem antibiotics such as faropenem, ritipenem and sulopenem. Why are penem antibiotics not active against *P. aeruginosa*?

Finally, I would like to express my deepest appreciation on winning the “Shiga Kiyoshi·Hata Sahachiro Prize”, and to express my sincere thanks and appreciation to our laboratory staff members and all the people who made such continuous efforts both day and night.