

## 【総説】

## バンコマイシン中間耐性 MRSA (VISA) の耐性機構と復帰抗生物質

平松 啓一<sup>1)</sup>・森本 ゆふ<sup>1)</sup>・馬場 理<sup>1)</sup>・佐々木 崇<sup>2)</sup>・菱沼 知美<sup>2)</sup>  
片山 由紀<sup>2)</sup>・松尾 美記<sup>2)</sup>・桑原 京子<sup>2)</sup>・上原 由紀<sup>3)</sup>・五十嵐雅之<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> 順天堂大学大学院医学研究科感染制御科学研究センター\*

<sup>2)</sup> 順天堂大学医学部微生物学教室

<sup>3)</sup> 順天堂大学大学院医学研究科感染制御科学講座

<sup>4)</sup> 微生物化学研究会

(平成 27 年 9 月 15 日受付・平成 28 年 2 月 29 日受理)

前世紀の化学療法の隆盛は、細菌感染症の克服、人類の健康増進、寿命の延長に大きく貢献した。しかし、21 世紀に入ると病原菌の抗菌薬に対する耐性化に伴う難治性の感染症が増えてきた。耐性菌の出現は製薬会社による新規抗生物質の開発の意欲を削ぐことにも繋がった。しかし、耐性菌の出現は必然であり、人類の誕生よりはるか以前から耐性菌は存在していた。したがって、新時代の化学療法は耐性菌に対する創薬が必要である。私たちは、天然物のスクリーニングからキノロン耐性菌に強い抗菌力を有するが、キノロン感性株には抗菌力を示さない、ナイボマイシン (nybomycin ; NYB) を発見した。NYB をキノロン耐性菌に作用させると、低頻度ではあるが NYB 耐性菌が出現した。しかし、NYB 耐性株は DNA gyrase に復帰変異を有しており、キノロン系薬に感性化していることが判明した。私たちは、NYB を復帰抗生物質 (reverse antibiotic ; RA) と命名した。この自然界から新しいジャンルの抗生物質を発見したことは、今後の抗菌薬開発に対する一つのヒントを与えるとともに、化学療法の再興に繋がると確信している。

**Key words:** MRSA, multi-drug resistance, reverse antibiotic, coevolution

## I. ブドウ球菌の誕生

ブドウ球菌は Macrococci から 2 億 5 千万年前に分岐し、哺乳動物に寄生して進化してきた。その後、ブドウ球菌属は、哺乳動物が分化したのと時期を一にして、爆発的にその菌種を増やしていった (Fig. 1)。すなわち、さまざまな哺乳動物種に適応したブドウ球菌種が進化・出現したと考えられる。黄色ブドウ球菌は、1 億年くらい前に霊長類に寄生した。その後、黄色ブドウ球菌はヒトに寄生するため、ヒトの免疫系の攻撃を避けるさまざまな手段を獲得した。例えば、白血球の溶解毒素や莢膜の産生による貪食回避、白血球遊走阻止蛋白や、組織結合タンパク質の産生、抗体による攻撃回避のための protein A 産生、免疫細胞の接近阻止のためのフィブリン産生などである。さらに、補体分解やヒトが産生する抗菌ペプチドをも阻害する (Table 1)。

## II. 黄色ブドウ球菌はすべての抗菌薬を克服した

黄色ブドウ球菌感染症との戦いの歴史のなかで、最大の業績は、Alexander Fleming によるペニシリン G (penicillin G ; PCG) の発見である。当時は十分な精製技

術がなく、臨床で使用可能な PCG を得ることが第 2 次世界大戦中の国々の重要な戦略的プロジェクトとなり、それに成功したのはイギリス、アメリカの研究者である。しかし、その後、黄色ブドウ球菌はすぐに PCG に対する耐性を獲得した。黄色ブドウ球菌は、菌種間の遺伝子交換システムを有している。一つはプラスミドによる形質転換であり、PCG 分解酵素 (ペニシリナーゼ) をコードする遺伝子 (*blaZ*) を担うプラスミドを獲得すると、PCG に耐性化する (Fig. 2)。このペニシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症治療を目的として、Fig. 3 に示すような多くの抗菌薬が発見・開発され、臨床使用されてきた。しかし、黄色ブドウ球菌は、これまでに開発されたすべての抗菌薬に対する耐性機構を獲得した。

黄色ブドウ球菌との戦いにおける人類史上第 2 の業績は、1960 年に、半合成ペニシリンとして「メチシリン (methicillin)」の合成に成功したことである (Fig. 4)。しかし、同年、Jevons が 5,440 の臨床分離株を調べたところ、3 株のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [MRSA]) が発見された<sup>1)</sup>。

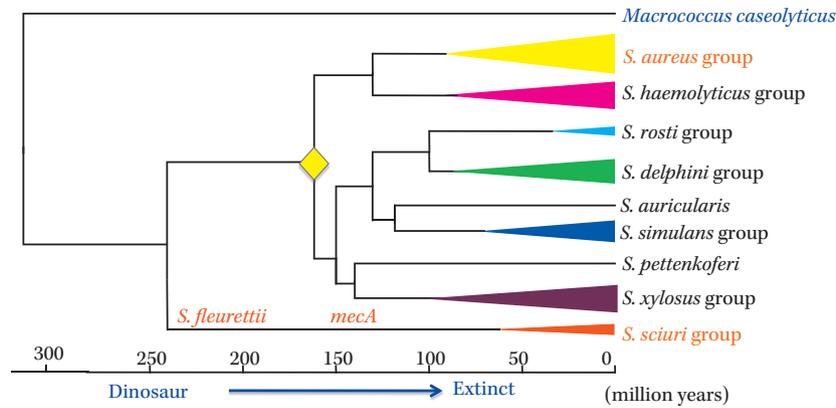


Fig. 1. Bayes tree based on 16S rRNA genes.

Staphylococci started colonizing mammals about 250 million years ago, and started co-evolution with them. The *S. aureus* group established themselves as the colonizers of primates. The original *mecA* gene is identified on the chromosome of an animal commensal staphylococci. Practically identical copy of *mecA* gene complex carried by the SCC*mec* was identified on the chromosome of a lately sequenced staphylococcal species *S. fleurettii*. *S. fleurettii* is one of the oldest staphylococcal species of *sciuri* group.

Table 1. *S. aureus* is a department store of toxins

TSST-1: a super-antigen causing toxic shock syndrome
Enterotoxins: causing food poisoning
Exfoliative (Epidermolytic) toxin-A, B: causing Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS), destroying the skin tissue
Haemolysin: destroying erythrocytes; $\alpha$ -toxin, $\beta$ -toxin (sphingomyelinase) $\gamma$ -toxin (Hlg2, LukF)
Leukocidin; destroying phagocytes, the first-line defense of our body
Others: coagulase, clumping factor, causing agglutination of blood; protein A to evade the attack of immunoglobulin; proteinase, DNase, lipase, to destroy the infected tissue.

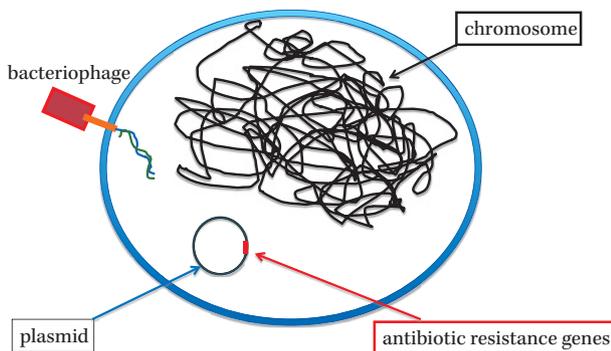
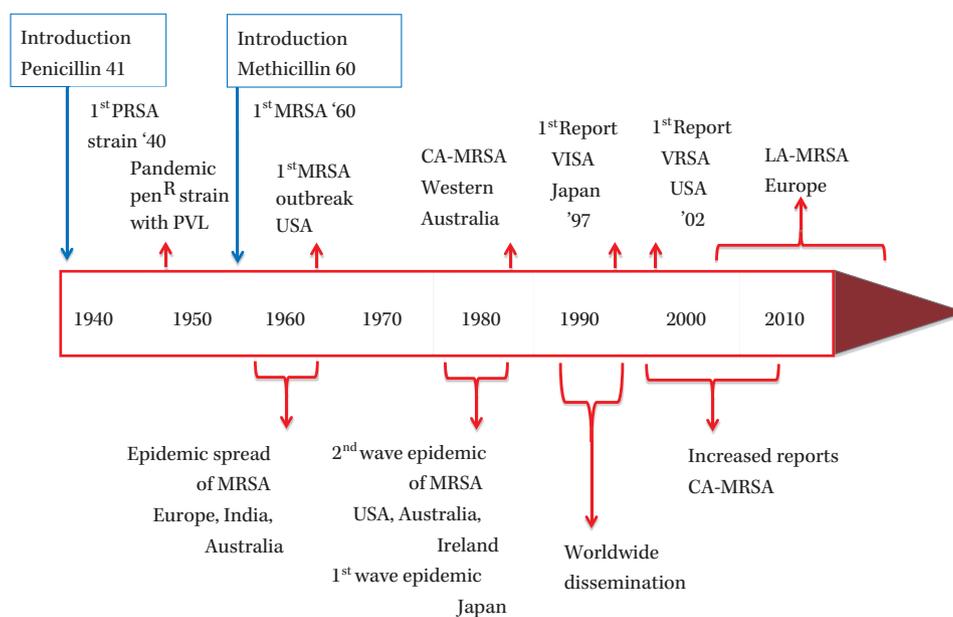


Fig. 2. Skillful exchange of genetic information helps *S. aureus* to become multiply resistant.

*S. aureus* is skilled in acquiring foreign genes by using plasmids and bacteriophages. Penicillin resistance was introduced into *S. aureus* by a plasmid carrying *blaZ* gene that encodes penicillinase.

これらの分離株は1960年に収集された菌株なので、MRSAはメチシリンの臨床使用以前から存在していたと考えられる。ペニシリンなどの $\beta$ -ラクタム系薬の作用点はペニシリン結合蛋白質 (penicilin-binding protein; PBP) と呼ばれている細胞壁合成酵素である。MRSAは、PBPの活性中心の構造が他のものと異なっており、ペニシリン系薬が結合しにくい。この特殊なPBPは、*mecA*と命名された遺伝子にコードされているPBP2' (あるいはPBP2a)である。*mecA*は、可動性DNA (mobile genetic element) であるStaphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*)によってブドウ球菌種間で伝達される (Fig. 5)。

SCC*mec*は*mecA*の発現の制御遺伝子である*mecR1*, *mecI*, カセット染色体組み替え酵素 (cassette chromosome recombinase) をコードする遺伝子 *ccrA*, *ccrB* とと



(Modified from Fitzgerald & Musser, MRSA: Current Perspectives 03)

Fig. 3. Development of multi-drug resistance phenotype of *S. aureus* since the advent of modern chemotherapy.

*S. aureus* continued to acquire antibiotic resistance and caused world-wide outbreak in the past 70 years. Recent examples of the epidemic strains are:

CA-MRSA (community-associated MRSA), LA-MRSA, (livestock-associated MRSA), VISA (vancomycin-intermediated *S. aureus*), VRSA (vancomycin-resistant *S. aureus*), etc.

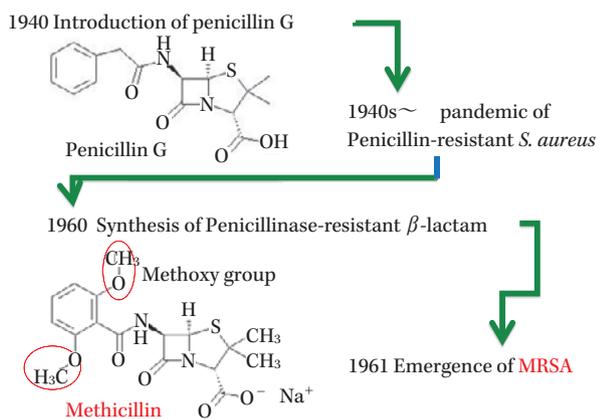


Fig. 4. Fighting back to penicillin-resistant *S. aureus*.

Methicillin is a chemically modified penicillin G. Two methoxy groups were introduced that protected the  $\beta$ -lactam ring from inactivation by penicillinase until 1960s when MRSA appeared that resist all the  $\beta$ -lactam antibiotics.

もに存在する。Ccrによって SCCmec は、染色体から切り出され、他菌株の染色体に挿入される。

### III. *mecA* 遺伝子の由来

*mecA* の由来に関しては、数年前に Tsubakishita らが明らかにするまで長い間謎であった<sup>2)</sup>。Fig. 1 にブドウ球菌の系統を示しているが、最初に分岐したブドウ球菌の菌種グループ *Staphylococcus sciuri* group に属する菌種

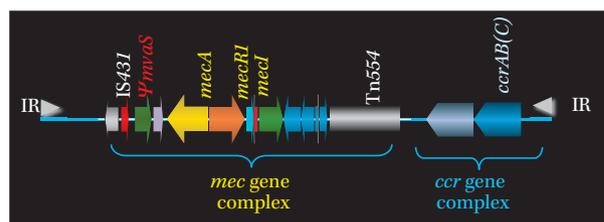


Fig. 5. The structure of SCCmec.

Methicillin-resistance gene *mecA* is introduced into *S. aureus* by staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec). *Mec* gene complex is composed of *mecA* and its regulator genes *mecR1* and *mecl*. The *ccr* gene complex encodes cassette chromosome recombinases.

*Staphylococcus fleurettii* の染色体上に *mecA* が発見された。黄色ブドウ球菌の染色体上にはない *mecA* 遺伝子が、2億5千万年前のブドウ球菌には存在したことになる。その理由は以下のように説明できる。*S. sciuri* グループに属するブドウ球菌の先祖は、哺乳動物への寄生に成功した。すると同菌株は土壤中に生息するペニシリン産生菌による攻撃に曝されなくなった。そのため、*mecA* を必要としなくなり、それ以降に分化した黄色ブドウ球菌を含むブドウ球菌属菌から *mecA* が脱落した。しかし、*S. fleurettii* が保持していた *mecA* は、ペニシリン耐性という汎用的機能をもった mobile DNA 'SCCmec' として広くブドウ球菌属に分布した。

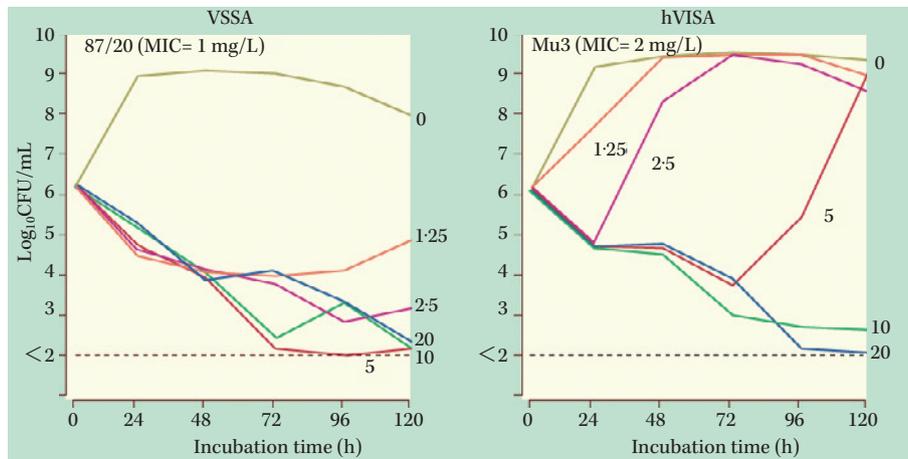


Fig. 6. The antimicrobial effect of vancomycin on hetero-VISA.

Hetero-VISA strain Mu3 (MIC = 2 mg/L) contains substantial number of resistant cells within its cellular population that resist antimicrobial activity of vancomycin. It is also noted that a certain cell subpopulation of a vancomycin-susceptible strain 87/20 is still viable after 5 days exposure to 10 mg/L of vancomycin (From THE LANCET Infectious Diseases 2001 Oct 1: 147-55). The numbers are concentrations of vancomycin in the medium in mg/L.

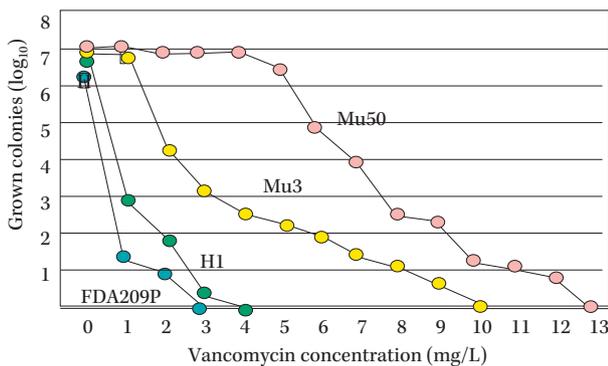


Fig. 7. Three categories in the mode of vancomycin susceptibility in *S. aureus* clinical strains.

*S. aureus* clinical strains are classified into one of the three categories based on the mode of vancomycin susceptibility: VSSA, hetero-VISA, and VISA represented by FDA209P and H1, Mu3, and Mu50, respectively. High level of vancomycin resistance is observed as vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) that carry *vanA* gene which was horizontally transferred from vancomycin-resistant enterococci (VRE). However, VRSA is rarely found in the world.

最近, *mecB* や *mecC* という *mecA* と類似の機能を有するが, アミノ酸相同性が低い PBP が報告された<sup>3)</sup>. およそ 3 億年以前ブドウ球菌の先祖である *Macrococcus* 菌属菌が保有していた *mecB* は, トランスポゾンとして plasmid や染色体に転位していたが, ブドウ球菌属菌には見出されていない<sup>4)</sup>. 初期のブドウ球菌属菌やその先祖である *Macrococcus* は, 環境中に存在する  $\beta$ -ラクタム系薬産生菌から自身を防御するために, これらの  $\beta$ -ラクタム耐性遺伝子をもっていたと考えられる。

#### IV. バンコマイシン (vancomycin ; VCM) は MRSA に有効か?

MRSA 感染症に対する第一選択薬は VCM. Clinical and Laboratory Standards Institute は, VCM の MIC が  $\leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$  の菌株を「感性」,  $4\sim 8 \mu\text{g}/\text{mL}$  の菌株を「中間耐性」,  $\geq 16 \mu\text{g}/\text{mL}$  の菌株を「耐性」と分類している。*S. aureus* FDA209P はブドウ球菌だが,  $3 \mu\text{g}/\text{mL}$  でその発育を完全に抑制できる。MRSA も  $3 \mu\text{g}/\text{mL}$  の VCM 添加でその発育抑制できる菌株が多い。しかし, MRSA には VCM にヘテロ耐性と呼ばれる菌株 (hetero-VISA ; hVISA), が存在する。hVISA の VCM に対する MIC 値は  $\leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$  以下であるが, 感受性株 (VSSA) と異なる挙動を示す。この代表株が Mu3 である。Mu3 をさまざまな VCM 濃度存在条件下で培養し, 経時的な生菌数の変化を Fig. 6 に示した。 $10^6$  cfu/mL 接種すると, コントロールとした抗菌薬非添加条件下では 24 時間後に増殖している。一方, VCM の MIC を超える  $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  存在下の 24 時間後の菌数はコントロールの  $1/10$  であるが, その後は菌が再増殖する。MIC の 2.5 倍の  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  存在下でも 3 日目から再増殖し, 最終的には増殖を抑えられない。Mu3 の Population 解析を行うと,  $4\sim 6 \mu\text{g}/\text{mL}$  でも少数のコロニーが出現し,  $9 \mu\text{g}/\text{mL}$  の VCM 濃度でも  $10^7$  のうち 10 個程度のコロニーが出現する (Fig. 7)。この耐性菌出現頻度は, リファンピシンに対する耐性菌出現率  $1/10^8$  と比較しても高頻度である。最近の報告では, MRSA 中 hVISA は 6.05% (99,042 株中), VISA は 3.01% (68,792 株中) とされている<sup>5)</sup>。

#### V. VISA の VCM 耐性メカニズム

Mu3 のような hVISA 株は VCM で治療すると, 最終的には高頻度に VISA となる。そのメカニズムは VCM

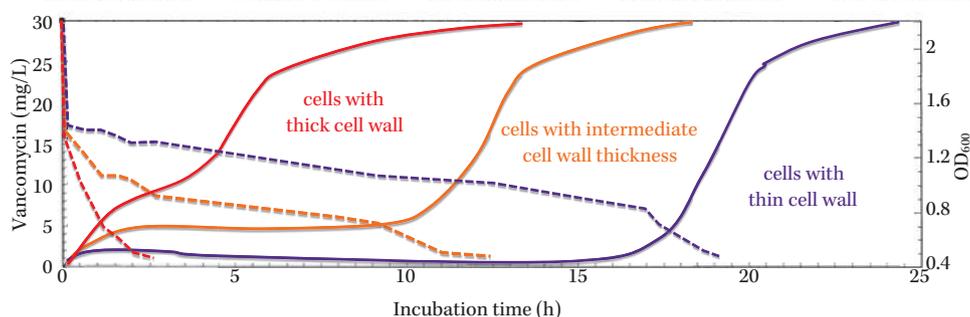


Fig. 8. Strategy of *S. aureus* to resist vancomycin (Modified from reference 9).

Ingenious mechanism of *S. aureus* to evade VCM attack reflects the unique mode of action of VCM.  $10^8$  CFU/mL of *S. aureus* cells having different levels of cell-wall thickness were inoculated in the medium containing  $30 \mu\text{g/mL}$  of VCM. VCM was quickly adsorbed to the cell-wall peptidoglycan (PG) of the *S. aureus* cells. The growth arrest was temporary, and the cells started to grow as the concentration of VCM declined below the MIC value of the strain.

Solid lines, growth curves; dotted lines, concentrations of VCM in the growth medium.

Table 2. The mutations underlying the hetero-VISA to VISA phenotypic conversion —every VISA is unique!—

hVISA strain (van MIC mg/L)	The number of mutations per genome	The number of strains	Mutated gene (The number signifies the <i>orf</i> Number of Mu3 genome [SAHV_#] †)								
Mu3 <i>graR</i> * (3)	4	1	[444	1286	1898	1980]					
	2	4	[12	<i>rpoA</i> ]	[ <i>rplL</i>	<i>rpoB</i> * 1]	[ <i>rpoB</i> * 2	2006]	[ <i>fmtC</i>	<i>atpA</i> ]	
	1	2	<i>rpoB</i> * 3	<i>rpsU</i>							
Mu3 <i>fdh2</i> * (3)	2	2	[ <i>rpoB</i> * 4	<i>recA</i>	[ <i>ansA</i>	<i>cmk</i> * 1]					
	1	8	372	<i>cmk</i> * 2	<i>rpoB</i> * 5	<i>tarO</i> * 1	<i>tarA</i>	<i>rpoC</i>	<i>cmk</i> * 3	<i>tarO</i> * 2	
Mu3 (2)	3	2	[506	1747	1906]	[1031	<i>opuD</i>	<i>tcaA</i> ]			
	2	2	[933	<i>potD</i> ]	[197	1760* 1]					
	1	6	1760* 2	2101	<i>tarO</i> * 3	<i>cmk</i> * 4	<i>cmk</i> * 5	256			
Mu3p27 ‡ (3)	2	3	[ <i>capP</i>	<i>ebhA</i>	<i>fmtB</i> ]	[ <i>purR</i>	<i>pbp4</i> * 1	<i>sigA</i> ]			
	1	15	<i>cmk</i> * 6	<i>pbp4</i> * 2	1392	612	<i>rpoB</i> * 6	<i>rpoB</i> * 7	<i>walK</i>	<i>pykA</i>	
			741	1209	<i>trpC</i>	<i>ureD</i>	<i>cmk</i> * 7	256	<i>gtaB</i>		
Total		45									

† Frequently affected genes

*rpoB*\* 7 times 1, R503H; 2, S746Y; 3, T480M; 4, Q1069E; 5, R406S; 6, G540V; 7, A1085V

*cmk*\* 7 times 1, K71N; 2, G129V; 3, I128N; 4, A20G; 5, A24V; 6, -13 base; 7, G201V

*tarO*\* 3 times 1, P94L; 2, F205L; 3, G169R

*pbp4*\* 2 times 1, Y65stop; 2, S140N

*SAHV\_1760*\* 2 times 1, S251I; 2, W200C

\* signifies that the gene is mutated

‡ This parent strain possessed 5 mutations: *tarG*, *alr*, 1545, 2804, 1983-1984

の特徴的な作用機序を逆手に取ったもので、従来の耐性メカニズムとまったく異なっている<sup>6)</sup>。VCMは、菌細胞1個当たり600万個の作用標的を細胞壁に保有している。しかし、この作用標的にVCMが結合しても細胞自体に傷害を与えることはない。しかし、細胞壁に結合したVCMは細胞壁に目詰まり(clogging)を生じ、VCMが細胞壁を通過して真の作用標的であるペプチドグリカンの構成材料であるムレインモノマーまで到達できなくする<sup>7)</sup>。このような本来の作用点とは異なる作用点はnon-vital target、あるいはpseudo-target(偽のターゲット)と呼ばれている。上記のメカニズムは、厚い細胞壁

を有する菌株と薄い菌株のVCMに対する感受性を比較すると明らかである<sup>8)</sup>。

$10^8$  cfu/mLの菌株を接種しただけで培地中に $30 \mu\text{g/mL}$ であったVCMの濃度が数分後に半分の $15 \mu\text{g/mL}$ に低下する(Fig. 8)。これは多くのVCMが細菌細胞の細胞壁に吸着・消費された結果である。培養時間が長くなると、VCMは消費され、培養液中の濃度は低下する。透過型電子顕微鏡で観察すると、実際にVISAの細胞壁は、感性株と比較すると肥厚している<sup>9)</sup>。正常なPBPの働きによる高密度の網目構造により細胞壁は物理的に強化される。一方、架橋密度の低い菌株は細胞壁の物理的強

Table 3. Nybomycin resistance is caused by reverse mutation of quinolone-resistant *S. aureus* Mu50<sup>13)</sup>

plate	No colonies	No. of cells plated	Appearance rate	Mu50 and mutants	MIC (mg/L)		AA in QRDR of	
					LVFX	NYB	ParC	GyrA
				Mu50	8	0.25	Ser80->Phe	Ser84->Leu
1	1	7.20E+10	1.39E-11	DN2-01	1	32	Ser80->Phe	Leu84->Ser
2	0	7.60E+10	0	—	—	—	—	—
3	2	5.00E+10	4.00E-11	DN2-03	1	32	Ser80->Phe	Leu84->Ser
4	1	5.70E+10	1.75E-11	DN2-04	1	16	Ser80->Phe	Leu84->Ser
5	0	8.30E+10	0	—	—	—	—	—
6	0	1.20E+11	0	—	—	—	—	—
7	0	1.00E+11	0	—	—	—	—	—
8	0	7.60E+10	0	—	—	—	—	—
9	10	6.60E+10	1.53E-10	DN2-09	1	32	Ser80->Phe	Leu84->Ser
10	1	7.30E+10	1.38E-11	DN2-10	1	32	Ser80->Phe	Leu84->Ser

LVFX: levofloxacin, NYB: nybomycin

度は低下するが、VCMの結合部位であるD-アラニル-D-アラニンが細胞壁に増加する。このようにVISAには、*mecA*のような特別な耐性化因子は必要ない。なぜVISAがhVISAから通常の耐性菌の出現頻度と比較して100倍程度の高い頻度で出現するのかを調べることを目的としてVCMでMu3からVISAを選択し、出現した45株のVISAの全ゲノム塩基配列を決定した<sup>10)</sup>。Table 2にその結果を示したが、合計20遺伝子に変異を認められた。驚くべきことに、VISA 45株はすべて異なる遺伝子変異あるいはその組み合わせを有していた。このことからVISAの出現において遺伝子変異の組み合わせは無限にあることから、通常の100倍の頻度で耐性菌が出現したと考えられた。

#### VI. VCM耐性を起こす遺伝子変異

Mu3からVISAが出現する際に、20の異なる遺伝子に変異が確認された。*rpoB*, *cmk*, *tarO*, *tarL*, *tarA*, *pbp4*などの機能が明らかな遺伝子にも変異が認められた。*pbp4*は、ペプチドグリカンのcross-linkingを強化する架橋酵素であり、変異によりその機能が低下する。その結果、架橋密度が低下するため細胞壁へのVCMの結合量が増加して目詰まりが生じ、VCM耐性度が上昇すると考えられる。黄色ブドウ球菌の表層に存在するタイコ酸は、ペプチドグリカンと共通の材料で合成される。したがって、タイコ酸の生合成経路が抑制されるとペプチドグリカンの合成量が増加し、細胞壁の厚さが増す。*cmk*はピリミジンの生合成系酵素のcytidylate kinaseで、その産物であるCDPはタイコ酸の合成に必要である。*tarO*, *tarL*, *tarA*に生じる変異も同様のメカニズムでVCM耐性に関与すると解釈される。*pykA*は解糖系や糖新生に重要なpyruvate kinaseという酵素をコードしている。*pykA*が変異してその機能活性が低下すると、ピルビン酸量は低下するが、ホスホエノールピルビン酸量は増加する。そのため、余剰のホスホエノールピルビン酸は、UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvateとなり、ペプチドグリカンの生合成に使用され、結果的にペプチド

グリカン生合成の上昇に繋がる。RNAポリメラーゼのサブユニットをコードする*rpoB*, *rpoC*などはタイコ酸合成系遺伝子群と同様、高頻度に変異が生じている<sup>11)</sup>(Table 2)。RNAポリメラーゼの遺伝子に生じた変異は、mRNAの発現パターンを変化させ、厚い細胞壁を生産する生理状態をつくり出すと考えられる。したがって、黄色ブドウ球菌のRNAポリメラーゼに生じる変異は細胞の生理調節機能をもった変異(Regulatory mutation)であると考えられる。

#### VII. 次世代の抗菌化学療法に向けて

MRSAによる重症感染症を確実に治療できる抗菌薬は、現時点において存在しない。過去70年の化学療法の歴史から、私たちはいかなる抗菌薬に対しても耐性菌は必ず出現することを学んだ。したがって、耐性菌の出現を許容し、耐性菌に対して強力な抗菌力を有する抗菌薬を開発する必要がある。上述のように抗菌薬も耐性菌も、人類の誕生以前から存在したので、耐性菌に対して抗菌力を示す抗菌性物質も存在していたと考えられる。そこで私たちは土壌細菌からMRSAに有効な抗菌性物質をスクリーニングした。約2,000株の土壌細菌の培養液のスクリーニングから、10株程度、VISA株Mu50に対する抗菌力を有する菌株が存在した。驚くべきことに、そのうちの1つは、Mu50に抗菌力を示したが、*S. aureus* FDA209Pにはまったく効果を示さなかった。当初、これはMRSAに特異的に有効な抗菌薬と考えたが、化学構造を決定したところ、既知の抗菌薬であるナイボマイシン(nybomycin; NYB)であった<sup>12)</sup>。その後の研究から、NYBはキノロン耐性株には強い抗菌力を示すが、キノロン感性菌には効果を示さないことが明らかとなった<sup>13)</sup>。NYBが開発された1950年代にはキノロン耐性菌が問題となっていなかったため、臨床開発の価値がなかったと考えられる。Mu50(NYBのMIC: 0.25 µg/mL)を親株としてNYB耐性菌(MIC: 32 µg/mL)を取得してlevofloxacin(LVFX)のMICを比較すると、8 µg/mLから1 µg/mLに低下していた。これらの菌株のDNA

Table 4. Nybomycin and apigenin as Reverse Antibiotics against Quinolone-resistant *S. aureus*

Strain	Category of the strain	AA substitution*		MICs (mg/L) †							
		ParC	GyrA	NFLX	OFLX	LVFX	CPFEX	TFLX	SPFX	NYB	API
NCTC8325	MSSA	w	w	<b>1</b>	<b>0.25</b>	<b>0.125</b>	<b>0.25</b>	<b>≤0.06</b>	<b>0.125</b>	>64	>128
FDA 209P	MSSA	w	w	<b>0.25</b>	<b>0.125</b>	<b>≤0.06</b>	<b>0.125</b>	<b>≤0.06</b>	<b>≤0.06</b>	64	128
N315	preMRSA	w	w	<b>1</b>	<b>0.25</b>	<b>0.125</b>	<b>0.25</b>	<b>≤0.06</b>	<b>≤0.06</b>	64	>128
Mu50	VISA	Ser80Phe	Ser84Leu	128	16	8	32	>128	16	<b>0.25</b>	<b>4</b>
VRS1	VRSA	Ser80Phe	Ser84Leu	>128	32	16	128	<b>4</b>	8	<b>0.125</b>	<b>4</b>
HIP07920	VISA	Glu84Lys	Ser84Leu	16	16	8	16	<b>4</b>	16	<b>0.25</b>	<b>4</b>
HIP5836 (NJ)	VISA	Ser80Tyr	Ser84Leu	128	64	8	16	32	32	<b>0.5</b>	<b>2</b>
HIP07930	VISA	Ile45Met, Ser80Phe	Ser84Leu	16	16	8	16	16	16	<b>0.25</b>	<b>4</b>
NRS118	VISA	Ser80Phe, Ser81Pro	Ser84Leu	128	64	32	32	>128	32	<b>0.25</b>	<b>4</b>
VRS3a	VRSA	Ser80Tyr, Glu84Lys	Ser84Leu	128	32	16	64	>128	16	<b>0.125</b>	<b>2</b>
HIP09662	VISA	Ser80Phe, Glu84Gly	Ser84Leu	64	32	32	32	>128	16	<b>1</b>	<b>4</b>
VRS5	VRSA	Ser80Tyr, Glu84Gly	Ser84Leu	>128	64	32	>128	>128	16	<b>≤0.06</b>	<b>2</b>
HIP09143	VISA	Ser80Phe, Glu84Lys	Ser84Leu	>128	64	32	64	>128	16	<b>0.25</b>	<b>2</b>
VRS4	VRSA	Ser80Tyr, Glu84Gly	Ser84Leu, Glu88Lys	>128	>128	>128	>128	>128	>128	<b>≤0.06</b>	<b>2</b>
KSA36	MRSA	Ser80Tyr	Ser84Leu, Glu88Gly	>128	>128	>128	128	>128	128	<b>≤0.06</b>	<b>0.5</b>
KBSA72	MRSA	Ser80Tyr, Glu84Lys	Ser84Leu, Glu88Gly	>128	>128	>128	128	>128	128	<b>≤0.06</b>	<b>0.5</b>
KBSA56	MRSA	Ser80Tyr, Glu84Val	Ser84Leu, Glu88Gly	128	>128	>128	64	>128	>128	<b>≤0.06</b>	<b>0.5</b>

MIC, minimum inhibitory concentration; NFLX, norfloxacin; OFLX, ofloxacin; LVFX, levofloxacin; CPFEX, ciprofloxacin; TFLX, tosufloxacin; SPFX, sparfloxacin; NYB, nybomycin; API, apigenin

\* 'w' stands for wild type (identical to those of strain FDA209P)

† MICs ≤ 4 mg/L are in bold

gyrase A subunit のキノロン耐性決定領域 (QRDR) のアミノ酸配列は出現した耐性株すべてにキノロン耐性に重要な変異である 84 番のロイシンがセリンに置換されていた<sup>13)</sup> (Table 3)。これは NYB 耐性株では、DNA gyrase A subunit の QRDR に生じていた耐性化のための変異が復帰変異 (back mutation あるいは reverse mutation) により感性型の DNA gyrase A subunit に戻ったことを意味する。NYB の再発見から、抗菌薬はその使用に伴って耐性菌は必ず出現するが、その耐性菌への対応に関して、大きなブレイクスルーに繋がる可能性がある。私たちは、NYB のような性質を有する抗菌薬を復帰抗生物質 (reverse antibiotic ; RA) と命名した<sup>13)</sup>。Table 4 に示すフラボン (flavone) 化合物であるアピゲニン (apigenin : API) もキノロン耐性株に RA としての抗菌活性を有している。Table 4 に DNA gyrase A と topoisomerase IV の QRDR のアミノ酸置換変異個所が異なる菌株の薬剤

感受性検査成績結果を示した。QRDR に変異がないキノロン感性株は NYB および API に対して耐性を示す。しかし、QRDR に 1~4 個のアミノ酸置換変異を有するキノロン耐性株に対しては、NYB および API の MIC は低値である。植物がつくる物質であるフラボンは、植物が陸上に進出した時期、紫外線から自身を守る (UV protection) 役割を果たしたと考えられる<sup>14)</sup>。一方、この時期、植物と生息場所が同一であった細菌は、API などの抗菌活性を有するフラボンに曝露されていたと考えられる。市販の 104 種類のフラボン誘導体の抗菌活性を調べてみると、API を含む 10 種に RA 活性が確認された。このことから、細菌は 4 億年前に植物が産生するフラボンに耐性を獲得するために、現在野生型と考えられている DNA gyrase, topoisomerase IV の QRDR を獲得したことが示唆される。一方、キノロン系薬に対して感性を示すフラボン耐性菌に対して人類がキノロン系薬を創製

Table 5. J-RA1 has a potent antibacterial activity against multi-drug-resistant *S. aureus* clinical strains in the world

QRDR AA substitution † in		Name of the strain	Category of the strain	MIC (mg/L) *					
ParC	GyrA			VCM	MPIPC	J-RA1	STFX	LVFX	NYB
w	w	NCTC8325	MSSA	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0.125</b>	<b>≤0.06</b>	<b>0.125</b>	>64
w	w	N315	pre-MRSA	<b>0.5</b>	32	<b>0.25</b>	<b>≤0.06</b>	<b>0.125</b>	64
w	w	FDA209P	MSSA	<b>0.5</b>	<b>≤0.06</b>	<b>0.25</b>	<b>≤0.06</b>	<b>≤0.06</b>	64
Ser80 → Phe	Ser84 → Leu	VRS1	VRSA	>128	>128	<b>≤0.06</b>	<b>0.5</b>	16	<b>0.125</b>
Ser80 → Phe, Glu84 → Lys	Ser84 → Leu	HIP09143	VISA	4	>128	<b>≤0.06</b>	2	32	<b>0.25</b>
Ser80 → Phe, Glu84 → Gly	Ser84 → Leu	HIP09662	VISA	4	>128	<b>0.125</b>	<b>1</b>	32	<b>1</b>
Ser80 → Phe, Ser81 → Pro	Ser84 → Leu	NRS118	VISA	8	>128	<b>≤0.06</b>	<b>0.5</b>	32	<b>0.25</b>
Ser80 → Tyr, Glu84 → Gly	Ser84 → Leu, Glu88 → Lys	VRS4	VRSA	>128	32	<b>0.125</b>	4	>128	<b>0.125</b>
Glu84 → Lys	Ser84 → Leu	HIP07920	VISA	4	128	<b>≤0.06</b>	<b>0.25</b>	8	<b>0.25</b>
Ser80 → Tyr	Ser84 → Leu	NJ	VISA	8	64	<b>≤0.06</b>	<b>0.5</b>	8	<b>0.5</b>
Ser80 → Tyr	Ser84 → Leu, Glu88 → Gly	KSA36	MRSA (VS)	<b>1</b>	>128	<b>≤0.06</b>	8	>128	<b>≤0.06</b>
Ser80 → Tyr, Glu84 → Lys	Ser84 → Leu	VRS3a	VRSA	>128	128	<b>≤0.06</b>	<b>0.5</b>	16	<b>0.125</b>
Ser80 → Tyr, Glu84 → Lys	Ser84 → Leu, Glu88 → Gly	KBSA72	MRSA (VS)	<b>1</b>	128	<b>≤0.06</b>	8	>128	<b>≤0.06</b>
Ser80 → Tyr, Glu84 → Gly	Ser84 → Leu	VRS5	VRSA	>128	128	<b>≤0.06</b>	<b>1</b>	32	<b>≤0.06</b>
Ser80 → Tyr, Glu84 → Val	Ser84 → Leu, Glu88 → Gly	KBSA56	MRSA (VS)	<b>1</b>	128	<b>≤0.06</b>	2	>128	<b>≤0.06</b>
Ile45 → Met, Ser80 → Phe	Ser84 → Leu	HIP07930	VISA	4	32	<b>≤0.06</b>	<b>0.25</b>	16	<b>0.25</b>

† 'w' stands for wild type (identical to those of strain FDA209P)

\*VCM, vancomycin; MPIPC, oxacillin; STFX, sitafloxacin; LVFX, levofloxacin; NYB, nybomycin  
MIC values equal to or smaller than 1 are highlighted (in yellow).

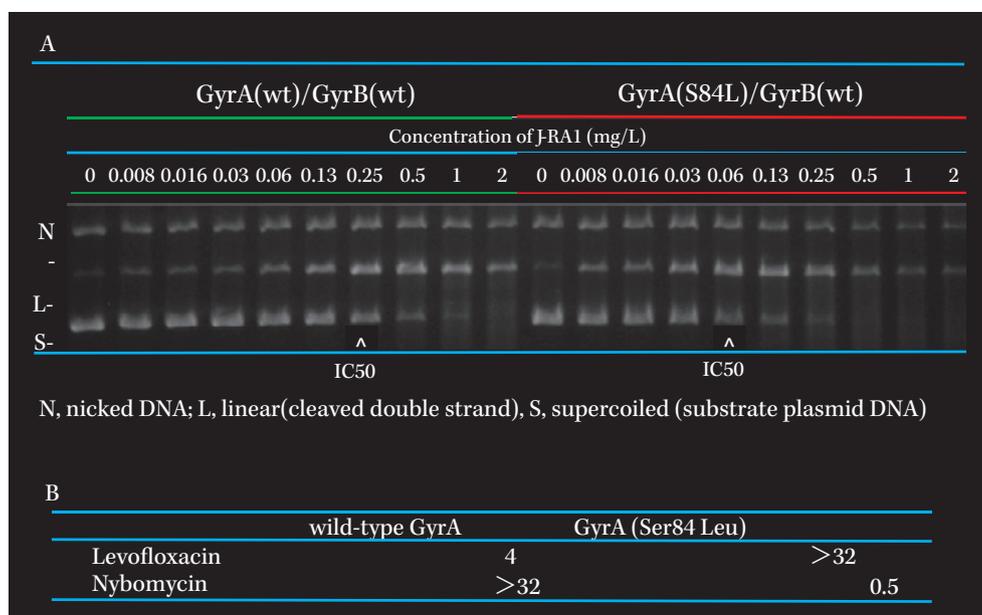


Fig. 9. Nybomycin-derivative compound J-RA1 has a strong inhibitory activity against both wild-type and quinolone-insensitive DNA gyrase of *S. aureus*.

(A) IC<sub>50</sub> of J-RA1 against the wild-type gyrase was 0.25 μg/mL, whereas that against QRDR-mutated gyrase [with *gyrA* (S84 L)] was 0.06 μg/mL, which corresponded well with the MIC values of the strains; 0.25 μg/mL and ≤0.06 μg/mL, respectively. (B) Comparison of IC<sub>50</sub> (μg/mL) of NYB and LVFX (Cleavage Assay) Quinolone antibiotic levofloxacin (LVFX) acts on wild-type *gyrA* but not on the mutated *gyrA*. Opposite correlation was observed in IC<sub>50</sub> values between nybomycin (NYB) and LVFX.

し、臨床応用した過程でキノロン耐性菌が出現した。この耐性株は、4億年前のフラボン感性株に類似の DNA gyrase, topoisomerase を復帰変異によって取り戻したと考えられる。すなわち、キノロン系薬はフラボン耐性株に対する RA であることになる。

私たちは NYB の化学構造を改変することによって臨床的に有用な化合物の創薬を目指しているが、Table 5 に示す J-RA1 はその一つで、キノロン系薬感受株と比較して耐性菌に対してより強い抗菌力を示す。被検菌株には世界各国から分離された VISA や VRSA を含む多剤耐性菌のなかには、シタフロキサシン (sitafloxacin ; STFX) に対する、MIC が 2~8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の菌株が存在する。一方、J-RA1 は STFX 耐性株に対する MIC は  $\leq 0.06\sim 0.125 \mu\text{g}/\text{mL}$  と低値である。すなわち J-RA1 は、キノロン系薬と相補的な活性を有しており、キノロン系薬と上手く使い分ければ多剤耐性黄色ブドウ球菌感染症の治療に使用できる可能性が期待される。J-RA1 の作用点は、キノロン系薬と同じ DNA gyrase と topoisomerase IV であるが QRDR に耐性変異を有する DNA gyrase に対してより強い親和性を有している (Fig. 9)。

さまざまな抗菌薬を使用すると必然的に耐性菌が出現するが、RA を用いて出現した耐性菌は、キノロン系薬などのような既存の抗菌薬に対する感受性が復活するので、多剤耐性化しにくくできると考えられる。将来、RA の創薬と開発によって抗菌薬と耐性菌の悪循環である「永遠の罠ごっこ」を解消し、自然界のバランスを崩さず化学療法を永続できると考えている。

#### 謝 辞

本稿の内容は第 63 回日本化学療法学会総会で発表した。本講演の機会をいただいた総会長の昭和大学医学部感染制御学講座の二木芳人教授、本公演の司会をしていただいた大分大学医学部呼吸器・感染症内科学講座の門田淳一教授、そして、創薬に関し、多くのアドバイスをいただいた早川勇夫氏、星野一樹氏に感謝する。

本研究は、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (平成 24~29 年 S1201013)、および、国立研究開発法人日本医療研究開発機構による創薬支援推進事業・創薬総合支援事業 (平成 27~29 年, DNW-14027) により支援された。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

#### 文 献

- 1) Jevons M P: "Celbenin"-resistant Staphylococci. Br Med J 1961; 1: 124-5
- 2) Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, Hiramatsu K: Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 4352-9
- 3) Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, et al: Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Infect Chemother 2013; 45: 117-36
- 4) Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Baba T, Hiramatsu K: Staphylococcal cassette chromosome mec-like element in *Macrocococcus caseolyticus*. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 1469-75
- 5) Zhang S, Sun X, Chang W, Dai Y, Ma X: Systematic Review and Meta-Analysis of the Epidemiology of Vancomycin-intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Isolates. PLoS One 2015; 10: e0136082
- 6) Hiramatsu K, Kayayama Y, Matsuo M, Aiba Y, Saito M, Hishinuma T, et al: Vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. J Glob Antimicrob Resist 2014; 2: 213-24
- 7) Cui L, Iwamoto A, Lian J Q, Neoh H M, Maruyama T, Horikawa Y, et al: Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 428-38
- 8) Cui L, Murakami H, Kuwahara-Arai K, Hanaki H, Hiramatsu K: Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 2276-85
- 9) Cui L, Ma X, Sato K, Okuma K, Tenover F C, Mami-zuka E M, et al: Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2003; 41: 5-14
- 10) Matsuo M, Cui L, Kim J, Hiramatsu K: Comprehensive identification of mutations responsible for heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA)-to-VISA conversion in laboratory-generated VISA strains derived from hVISA clinical strain Mu3. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57: 5843-53
- 11) Aiba Y, Katayama Y, Hishinuma T, Murakami-Kuroda H, Cui L, Hiramatsu K: Mutation of RNA polymerase  $\beta$ -subunit gene promotes heterogeneous-to-homogeneous conversion of  $\beta$ -lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57: 4861-71
- 12) Strelitz F, Flon H, Asheshov I N: Nybomycin, a new antibiotic with antiphage and antibacterial properties. Proc Natl Acad Sci U S A 1955; 41: 620-4
- 13) Hiramatsu K, Igarashi M, Morimoto Y, Baba T, Ume-kita M, Akamatsu Y: Curing bacteria of antibiotic resistance: reverse antibiotics, a novel class of antibiotics in nature. Int J Antimicrob Agents 2012; 39: 478-85
- 14) Cheyner V, Comte G, Davies K M, Lattanzio V, Martens S: Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. Plant Physiol Biochem 2013; 72: 1-20

## The mechanism of vancomycin resistance in VISA and the role of reverse antibiotic (RA)

Keiichi Hiramatsu<sup>1)</sup>, Yuhu Morimoto<sup>1)</sup>, Tadashi Baba<sup>1)</sup>, Takashi Sasaki<sup>2)</sup>,  
Tomomi Hishinuma<sup>2)</sup>, Yuki Katayama<sup>2)</sup>, Miki Matsuo<sup>2)</sup>, Kyoko Kuwahara<sup>2)</sup>,  
Yuki Uehara<sup>3)</sup> and Masayuki Igarashi<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Research Center for Infection Control Science, Graduate School of Medicine, Juntendo University, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

<sup>2)</sup> Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Juntendo University

<sup>3)</sup> Infection Control Science, Graduate School of Medicine, Juntendo University

<sup>4)</sup> Institute of Microbial Chemistry

Anti-bacterial chemotherapy of the last century has greatly contributed to the welfare and prolongation human life by conquering the threat of bacterial infection. However, in 21st century, we started to notice the rise of antimicrobial resistance in the pathogenic bacteria causing infection refractory to chemotherapy. That trend suppressed the motivation of pharmaceutical companies to develop new antimicrobial agents. However, it is important to regard the resistance emergence is an inevitable result since resistance has been a phenomenon existent since much before the rise of humans on the earth. Given this, it is necessary for us to raise antimicrobials against antibiotic-resistant pathogens. We re-discovered a natural antibacterial substance called nybomycin by screening the soil bacterial culture, which exhibited potent antimicrobial activity against quinolone-resistant bacteria but poor activity against quinolone-susceptible bacteria. Although at a very low frequency, bacteria do produce nybomycin-resistant mutants. However, we found that the resistant mutants carried a reverse mutation in a codon of *gyrA* gene encoding DNA gyrase subunit A, which cured the bacteria of quinolone resistance. We designated nybomycin reverse antibiotic(RA). We expect that this discovery of new genre of antibiotic class in nature would lead to revitalization of chemotherapy.