

臨床由来緑膿菌のニューキノロン剤耐性変異について

加藤 広行・都 築 博¹⁾・伊豫部志津子²⁾

群馬大学医学部第一外科学教室* (主任：長町幸雄教授)

¹⁾群馬大学医学部微生物学教室 (主任：橋本 一教授)

(平成2年3月1日受付・平成2年6月14日受理)

臨床分離の緑膿菌を用いて、ニューキノロン剤、特にNFLX耐性について、薬剤感受性、血清型、ファージ型を検討し、さらに耐性変異株およびその外膜タンパク質を検討した。

1) 1986年頃より使用量の増加に伴いNFLX耐性緑膿菌の分離頻度の増加を認めた。

2) 血清型ではNFLX耐性株および感受性株においても、B型、G型、分類不能型が多く、特定の型別の増加はなかった。ファージ型でも両者共に、Hh8型が最も多く、血清型と同様、院内感染による特定の型別の増加はなかった。

3) 感受性株を用いた耐性変異株ではnfx C typeの分離頻度が最も多かったが、他のタイプ、nfx A, nfx B, nal B typeの分離頻度も大差はなかった。

4) 臨床分離のNFLX感受性株の外膜タンパク質においては、Omp Dに相当する外膜タンパク質で様々なパターンを示すことがわかった。

nfx A typeの変異株で外膜タンパク質の変化はなく、nal B typeでは約48 KDのタンパク質の新生、nfx B typeでは約50, 52 KDのタンパク質の新生がみられた。nfx C typeでは外膜タンパク質の新生および消失など種々であった。

Key words : *Pseudomonas aeruginosa*, New quinolone, Serotype, Phage type, Resistant mutation

近年ヒリドンカルボン酸系抗菌剤は、抗菌力・抗菌スペクトルともに一段と優れ、ことに良好な組織移行性を示す薬剤として一躍注目されている。1964年に nalidixic acid (NA)が開発されて以来、piromidic acid (PA), pipemidic acid (PPA), cinoxacin (CINX) が市販されているが、近年ニューキノロン剤と呼称され、グラム陽性菌およびグラム陰性菌、特に *Pseudomonas aeruginosa* に対しても高い抗菌力を有する norfloxacin (NFLX), ofloxacin (OFLX), enoxacin (ENX), ciprofloxacin (CPFX) が開発されてきた。

我々は群馬大学付属病院において分離された緑膿菌を用いて、薬剤感受性、血清型およびファージ型について報告した¹⁾。

そこで今回は、緑膿菌のニューキノロン剤、特にNFLX耐性について、上記の生物型をまとめ、さらに臨床分離株がNFLX耐性化変異をする場合、それがどのような機構で出現するかを解析したので、その結果を報告する。

I. 材料と方法

1. 菌株と同定

1984年4月から1988年3月までに群馬大学付属病院において分離された緑膿菌479株(一患者1株)、および標準株として微生物学教室保存の緑膿菌PAO 1およびPAO 2142を対象とした。

2. 使用薬剤

Carbenicillin (CBPC, 台糖ファイザー), piperacillin (PIPC, 富山化学), cefsulodin (CFS, 武田薬品), ceftazidime (CAZ, 日本グラクソ), imipenem (IPM, メルク万有), aztreonam (AZT, エーザイ), kanamycin (KM, 武田薬品), gentamicin (GM, 日本シェーリング), amikacin (AMK, メルク万有), nalidixic acid (NA, 第一製薬), norfloxacin (NFLX, 杏林製薬), tetracycline (TC, 台糖ファイザー), chloramphenicol (CP, 三共)を用いた。

耐性限界については、Mueller-Hinton寒天培地を用いて、寒天平板希釈法(日本化学療法学会標準法²⁾)にてMIC測定を行い、耐性限界値を制定した。限界値はPIPC, CFS, CAZ, AZT, AMK, 100 $\mu\text{g/ml}$; GM, 50 $\mu\text{g/ml}$; IPM, 12.5 $\mu\text{g/ml}$; NFLX, 3.13 $\mu\text{g/ml}$ と

測定し、それ以上のMICを示す株を耐性株とした。緑膿菌の場合、薬剤感受性の分布の山が広いのでIPM, NFLX以外の薬剤に対しては明らかな耐性といえるのは上記限界値以上の株である。

3. 血清型別

緑膿菌型別用モノクローナル抗体(明治製薬)を用い、その使用方法に準じてスライド凝集法にて施行した。

1. フェージ型別

フェージおよびその増殖用菌株は財団法人発酵研究所より入手し、型別の方法は既報²⁾の通り行った。培地はPYN(1%ポリソフトン, 0.3%酵母エキス, 0.2%塩化ナトリウム, pH 7.2), PYNK(0.4%硝酸カリウム加PYN), PYNA(1.5%寒天加PYN)および軟寒天(0.8%寒天加PYN)を使用した。

5. NFLX 耐性変異株の選択

臨床由来の感受性株38株、臨床分離株GU(Gunma University)-6086、標準株PAO1, PAO2142を被検菌として、Mueller-Hinton液体培地で一晚培養後、その0.1 mlをその菌株MICの4倍濃度のNFLXを含有したMueller-Hinton寒天培地に接種し、得られたコロニーを純粋培養後に安定な耐性株を選択した。耐性菌分離頻度はNFLXを含有しないMueller-Hinton寒天培地とCFU(colony forming unit)を比較して求めた。

6. 耐性変異株のタイプ別

元株と耐性変異株の薬剤感受性の変化を比較し、NFLX耐性のタイプを平井ら⁶⁻⁸⁾の分類を用いてnfx A, nfx B, nfx C, nal B, non-typableに分けた。

nfx A typeはピリドンカルボン酸系抗菌剤のみに耐性化するものであり、nfx B typeはピリドンカルボン酸系抗菌剤の耐性化に伴いβ-ラクタム剤、アミノグリコシド剤の感受性化を認めるものとした。nfx C typeはピリドンカルボン酸系抗菌剤に加えて、IPM, CPの耐性化を認め、一方β-ラクタム剤、アミノグリコシド剤に感受性化したものであり、nal B typeはピリドンカルボン酸系抗菌剤のほかβ-ラクタム剤、TC, CPに対して感受性の低下を認めるものとした。

7. 外膜タンパク質の電気泳動

a) 外膜蛋白の抽出(Poxtonら⁹⁾の方法)

1) 菌株を0.5% NaCl加1.0% proteose peptone No. 2(Difco) 10 ml中で、37°C、一夜培養し、それを同様のbroth 200 mlに加えて、37°C、6時間振とう培養。

2) 菌体を7000 rpm、4°C、15分遠心にて集菌し、10 mM HEPES buffer(pH 7.4) 20 mlにて1回洗浄。次に同じbuffer 4 mlに懸濁し、約10分超音波にて破

碎。

3) 破砕液を7,000 rpm、4°C、15分遠心し、上清液にsarkosylを加えて、40,000 rpm、4°C、40分超遠心を2回行い、洗滌物を取りさらに蒸留水で2回洗浄、洗滌物を超遠心により採集。

4) 洗査を0.5 mlの蒸留水に懸濁し凍結保存。

5) 電気泳動前処理として、60 μg蛋白に同量のsample buffer(4% SDS, 10% mercaptoethanol, 20% glycerol, 1.5% Tris buffer, 10% bromophenol blue, pH 6.8)を混和し、100°Cにて2分間煮沸。

b) SDS polyacrylamide gel 電気泳動

1) スタッキングゲルは5%アクリルアミド、8%アクリルエイドクロスリンカー(タカラ)、0.1% SDS、1.5% Tris bufferを加えて混合し、セパレートゲルは14%アクリルアミド、22%アクリルエイドクロスリンカー、0.1% SDS、1.5% Tris bufferを加えて混合した。それぞれのゲルは過硫酸アンモニウムを触媒として、TEMED(N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine)を重合開始剤とした。

2) 泳動はLaemmli¹⁰⁾の方法に準じて行い、0.192 M glycine, 0.025 M Tris buffer, 0.1% SDSの緩衝液を用いて、20 mAで8~10時間行った。

3) 染色は0.1% Coomassie brilliant blue, 10% acetic acid, 50% methanol染色液に室温で2時間浸し、ついで10% methanol, 10% acetic acid脱色液で処理した。

II. 結 果

1. NFLX に対する薬剤感受性

1984年から1987年までに群馬大学付属病院で分離された緑膿菌についてNFLXに対する薬剤感受性分

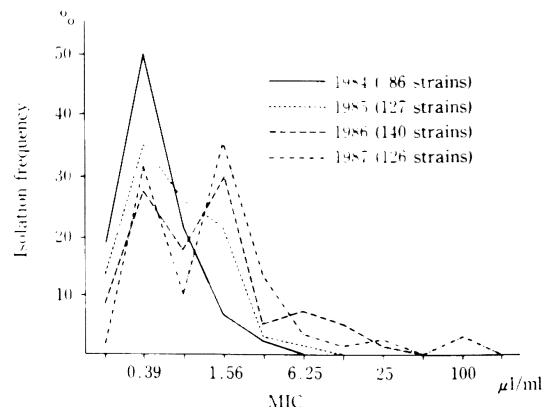


Fig. 1. Susceptibility distribution of *Pseudomonas aeruginosa* against norfloxacin

布を Fig. 1 に示す。1984 年には 0.39 $\mu\text{g/ml}$ を中心とした一峰性の分布を示していたが、1985 年には 4 倍高い MIC を示す菌が増加しはじめていた。1986 年、1987 年は三峰性以上の分布を示し、明らかな耐性菌の出現も認められた。そして 1987 年には MIC が 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高度耐性株の出現を認めた。

MIC 3.13 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性菌の年次変化を Table 1 に示す。1984 年には 1.2% しか分離されていないが、以後経年的に 3.9%、16.4%、21.4% となり、年々耐性菌の分離頻度の著しい増加を認めた。

2. NFLX 耐性株の血清型とフェージ型

1984 年 4 月から 1987 年 9 月までの NFLX 耐性株 42 株と感受性株 37 株を対象とした。抗緑膿菌剤 (PIPC, CFS, CAZ, IPM, AZT, GM, AMK, NFLX) に対する耐性型別、および血清型別について、Table 2 に示す。NFLX 耐性株および感受性株において、同様

に B 型、G 型、分類不能型が多く、耐性株には H 型が少なかったが、感受性株に比べて著明な相違を認めなかった。

次に NFLX 耐性株と感受性株のフェージ型別を Table 3 に示す。NFLX 耐性株および感受性株のフェージ型は多彩であり、Hh8 型つまり型別不能株が最も多かった。感受性株は 37 株中 9 株 (24%) が Hh8 型であった。NFLX 耐性株全体では 42 株中 19 株 (45%) が Hh8 型であったが、そのうち NFLX 単独耐性株についてみると 24 株中 9 株 (38%) が Hh8 型であった。NFLX 耐性株の他の薬剤に対する耐性を考慮に入れると、GM 耐性を示す NFLX 耐性株 9 株中 8 株 (90%) が Hh8 型であり、NFLX 耐性株に Hh8 型が 45% と多いのは、GM 耐性の NFLX 耐性株によるものと考えられる。NFLX 単独耐性株と感受性株とは統計学的有意差は認められなかった。

3. NFLX 耐性変異株

臨床由来の感受性株 38 株を用い、それぞれの株を NFLX の 4 倍 MIC 濃度で選択して得られたコロニーを任意にとり、各々の株から 1 株ずつ耐性変異株を分離した。各変異株について他の種々の薬剤感受性を調べ、各 MIC の変化から NFLX 耐性変異株のそれぞれをタイプ別に分類した。各タイプの分離頻度の結果を Table 4 に示す。タイプ別にみると nfx C type が最も多く 23 株 (66.5%) であった。変異株出現頻度は、nfx C type が得られた 1 株が約 10^{-7} で高頻度であったが、

Table 1. Isolation frequency of norfloxacin-resistant strains (%)

Year	No. of strains	No. of norfloxacin resistant strains (%)
1984	86	1 (1.2%)
1985	127	5 (3.9)
1986	140	23 (16.4)
1987	126	27 (21.4)
Total	479	56 (11.7%)

Table 2. Serotype of norfloxacin resistant and -sensitive strains

Drug resistance pattern								No. of strains in each serotype															
P I P C	C F S	C A Z	I P M	A Z T	G M	A M K	N F L X	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	(-)	Total
							●						1	5	1	1				1		6	24
●							●			1										1		3	6
					●		●								1								1
●		●					●																1
●	●						●																1
●		●		●			●								1							1	2
●					●		●			1										1			2
●			●			●	●							1									1
●	●	●		●	●		●															1	1
NFLX-resistant strain								4	8	2	0	0	1	6	2	3	0	0	1	3	0	12	42
NFLX-sensitive strain								2	6	2	2	1	0	8	6	2	0	0	0	2	0	6	37

PIPC : piperacillin, CFS : cefsulodin, CAZ : ceftazidime, IPM : imipenem, AZT : aztreonam, GM : gentamicin, AMK : amikacin, NFLX : norfloxacin

Table 3. Phage-type of norfloxacin resistant and sensitive strains

Drug resistance							Phage type																TOTAL									
PIP	CFS	CAZ	IPM	AZT	GM	AMK	NFLX	Aa8	Af8	Ah5	Ah8	Bb8	Bf8	Ca8	Cb6	Cb5	Ch8	Df8	Ea8	Eb8	Ef6	Ef8		Fb8	Fh5	Fh8	Ha5	Ha8	Hf8	Hh5	Hh8	
							●	1			1	1						1	3	2				3				1		1	9	24
●							●	1		1							1									2			1		6	
					●		●																							1	1	
●		●					●												1											3	3	
●	●						●																						1	1		
●		●					●																							2	2	
●		●					●																							2	2	
●				●			●																	1						1	1	
●	●	●			●		●																							1	1	
●	●	●			●		●																							1	1	
TOTAL							2	1	1	1	1						1	1	4	2				4		2	1	1	1	1	19	42
Sensitive strain								1			1				1	1	1	2	1	1	1	1	1	3	3	1	2	1	1	2	9	37

PIP: piperacillin, CFS: cefsulodin, CAZ: ceftazidime, IPM: imipenem, AZT: aztreonam, GM: gentamicin, AMK: amikacin, NFLX: norfloxacin

Table 4. Norfloxacin-resistant mutation in clinical isolates

Type*	No. of strains isolated (%)
nfx A	5 (13.2)
nfx B	7 (18.4)
nfx C	23 (66.5)
nal B	2 (5.3)
NT	1 (2.6)
Total	38 (100.0)

NT: non-typable
 *: according to Hirai⁶⁻⁸⁾

Table 5. Norfloxacin-resistant mutation in GU-6086, PAO 1, PAO 2142

Type	No. of strains isolated (%)		
	GU-6086	PAO 1	PAO 2142
nfx A	7 (9.7)	2 (2.7)	22 (68.8)
nfx B	37 (51.4)	9 (12.3)	10 (31.2)
nfx C	28 (38.9)	56 (76.8)	
nal B		4 (5.5)	
NT		2 (2.7)	
Total	72 (100.0)	73 (100.0)	32 (100.0)

NT: non-typable

ほかはすべて約10⁻⁹であった。NT (non-typable) の1株は、その薬剤感受性の変化が、NFLXの耐性に加えてβ-ラクタム剤の感受性の上昇およびアミノグリコシド剤の感受性の低下を示し、既報にその例のないものであった。

次に臨床分離株 GU-6086、標準株 PAO 1、PAO 2142を用い、任意の1コロニーでなく、得られた多数の耐性変異コロニーについて、薬剤感受性の変化をみた結果を Table 5 に示す。臨床分離株 GU-6086 の72株の耐性変異株のタイプ別は、nfx A、nfx B、nfx C の3種類で nfx B、nfx C がそれぞれ37株 (51.4%)、28株 (38.9%) と多かった。標準株 PAO 1 の73株の耐性変異株のタイプ別は、nfx A、nfx B、nfx C、nal B、NT (non-typable) の5種類で、nfx C が最も多く56株 (76.8%) であった。NT (non-typable) の2株の薬剤感受性は、β-ラクタム剤の感受性の上昇およびアミノグリコシド剤の感受性の低下を示したものであった。標準株 PAO 2142 の32株の耐性変異株のタイプ別は、nfx A、nfx B の2種類で、nfx A がやや多かった。臨床分離株 GU-6086、標準株 PAO 1、PAO 2142 の耐性変異株を比較すると、菌株毎にタイプ別は様々であった。

4. 外膜タンパク質の変化

臨床由来の感受性株38株のうちGU-1からGU-16の元株とその耐性変異株の外膜タンパク質を SDS-ア

Table 6. MICs of NFLX resistant mutants

		MIC ($\mu\text{g/ml}$)									
		NFLX	PIPC	CBPC	CFS	IPM	GM	KM	TC	CP	TYPE
GU-1	wild	0.78	3.13	50	3.13	3.13	6.25	400	25	200	
	mutant	12.5	1.56	25	1.56	12.5	6.25	100	50	1,600	nfx C
GU-2	wild	1.56	3.13	25	1.56	1.56	6.25	100	25	100	
	mutant	12.5	3.13	50	3.13	3.13	6.25	400	50	100	nfx A
GU-3	wild	1.56	1.56	25	1.56	1.56	6.25	400	25	100	
	mutant	12.5	3.13	50	1.56	12.5	6.25	400	50	1,600	nfx C
GU-4	wild	1.56	3.13	50	3.13	0.78	12.5	400	50	200	
	mutant	12.5	3.13	25	3.13	1.56	12.5	400	50	100	nfx A
GU-5	wild	0.78	3.13	50	3.13	1.56	6.25	100	25	200	
	mutant	25	12.5	200	12.5	1.56	6.25	200	100	400	nal B
GU-6	wild	0.78	3.13	25	3.13	3.13	6.25	200	12.5	100	
	mutant	6.25	3.13	25	1.56	6.25	6.25	200	12.5	200	nfx A
GU-7	wild	0.78	1.56	12.5	1.56	1.56	12.5	100	12.5	50	
	mutant	12.5	1.56	3.13	1.56	0.78	1.56	50	50	200	nfx B
GU-8	wild	1.56	3.13	6.25	1.56	0.78	0.39	50	25	100	
	mutant	12.5	3.13	3.13	0.78	6.25	0.39	50	50	1,600	nfx C
GU-9	wild	0.78	3.13	25	1.56	1.56	3.13	100	25	200	
	mutant	25	1.56	12.5	1.56	0.78	1.56	50	100	400	nfx A
GU-10	wild	1.56	1.56	50	1.56	3.13	3.13	200	25	200	
	mutant	12.5	0.78	12.5	0.78	12.5	1.56	50	50	1,600	nfx C
GU-11	wild	0.78	1.56	25	1.56	3.13	3.13	200	25	100	
	mutant	12.5	0.78	12.5	0.78	12.5	1.56	50	50	1,600	nfx C
GU-12	wild	1.56	1.56	25	1.56	1.56	12.5	100	25	200	
	mutant	12.5	0.78	12.5	1.56	12.5	3.13	50	50	1,600	nfx C
GU-13	wild	1.56	3.13	50	3.13	3.13	6.25	100	25	200	
	mutant	12.5	1.56	25	1.56	3.13	3.13	100	50	400	nfx A
GU-14	wild	1.56	1.56	25	1.56	1.56	1.56	50	100	200	
	mutant	25	3.13	3.13	1.56	1.56	1.56	50	100	200	nfx B
GU-15	wild	0.78	3.13	50	1.56	1.56	3.13	100	12.5	100	
	mutant	25	12.5	100	12.5	3.13	3.13	100	25	400	nal B
GU-16	wild	0.78	1.56	25	1.56	3.13	3.13	200	50	200	
	mutant	12.5	0.78	12.5	0.78	12.5	1.56	100	50	1,600	nfx C

NFLX : norfloxacin, PIPC : piperacillin, CBPC : carbenicillin, CFS : cefsulodin, IPM : imipenem, GM : gentamicin, KM : kanamycin, TC : tetracycline, CP : chloramphenicol

クリルアミド電気泳動を用い解析した。Table 6には各株の薬剤感受性の変化を示した。DNA gyraseの変化と考えられる nfx A type のものはすべて外膜タンパク質に変化が認められなかった (GU-2, 4, 6, 9, 13)。

他のタイプには外膜タンパク質の増減があり、その結果を Fig. 2 に示し、実際例を Fig. 3 に示した。

感受性株についてみると、分子量約 36 K Dalton 以下の外膜タンパク質 (Omp F, G, H に相当) においてはすべて同様なパターンであるが、分子量約 48 K~60 K Dalton の外膜タンパク質 (Omp D に相当) に関しては菌株毎に相違を認め、主に 2 種類に分類された。すなわち 1 本のバンドを示すもの (GU-1, 5, 10, 11, 12, 15, 16) と 2 本のバンドを示すもの (GU-3, 7, 8, 14) が認められた。

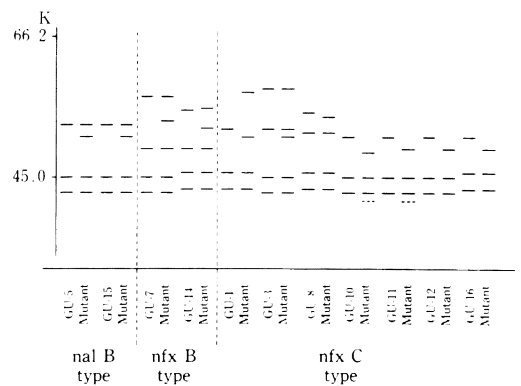


Fig. 2. Comparison of outer membrane proteins of norfloxacin resistant mutants

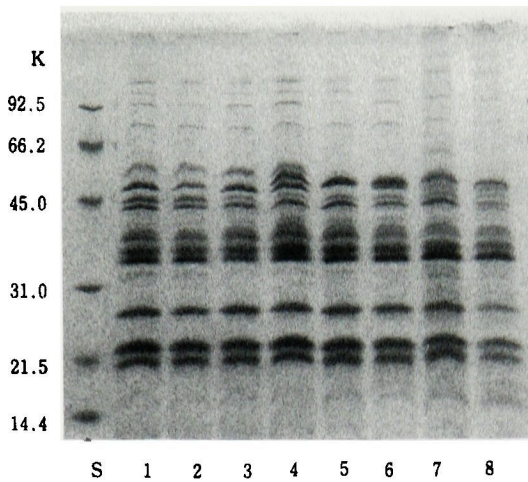


Fig. 3. Comparison of outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* strains by SDS-PAGE

Lane S: molecular weight standards.
 Lane 1: wild strain No.13.
 Lane 2: mutant (nfx A type) of No.13.
 Lane 3: wild strain No.14.
 Lane 4: mutant (nfx B type) of No.14.
 Lane 5: wild strain No.15.
 Lane 6: mutant (nal B type) of No.15.
 Lane 7: wild strain No.16.
 Lane 8: mutant (nfx C type) of No.16.

膜透過性の変化による耐性変異株 (nfx B, nfx C, nal B type) では分子量約 48 K~60 K Dalton のタンパク質 (Omp D に相当) に元株との相違が認められたが、分子量約 36 K Dalton 以下では元株と同様なパターンであった。nfx B type の 2 株 (GU-7, 14) では新たなバンドの出現を認め、それぞれ約 52 K および 50 K Dalton のタンパク質であった。nfx C type では、外膜タンパク質の様々な相違が認められ、新たなタンパク質が出現するもの (GU-1, 3) や減少ないし消失するもの (GU-8) や元株のバンドが消え、分子量が異なるものが新しく現れるもの (GU-10, 11, 12, 16) が認められた。GU-10, 11, 12, 16 の菌株では元株の外膜タンパク質のパターンが同様であり、耐性変異株 (nfx C type) の外膜タンパク質の変化もほぼ同じパターンを示していた。nal B type (GU-5, 15) では両者とも同様であり、約 48 K Dalton の新しいタンパク質の出現が認められた。

PAO 耐性株と 1 つの臨床分離株 GU-6086 から得られた種々の耐性変異株について共に外膜タンパク質を調べた (Fig. 4)。分子量約 36 K Dalton 以下の外

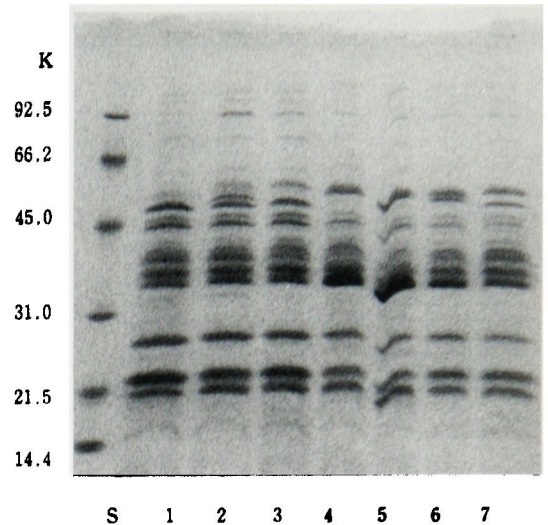


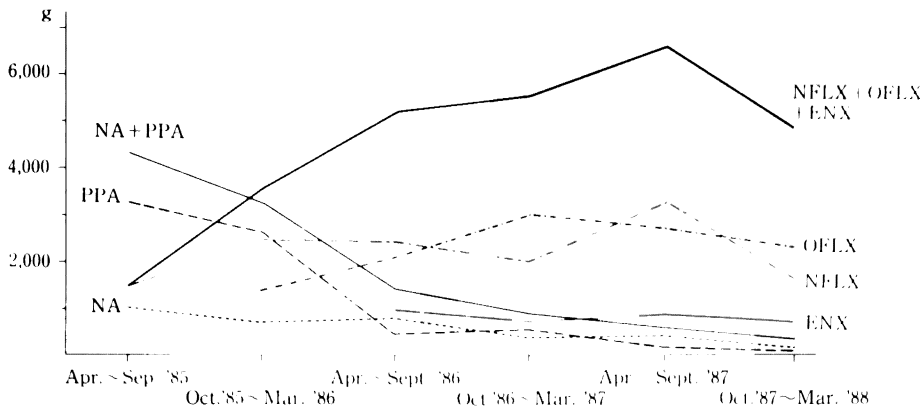
Fig. 4. Comparison of outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* strains by SDS-PAGE

Lane S: molecular weight standards.
 Lane 1: PAO 4009.
 Lane 2: KH4013E (nfx B).
 Lane 3: KH4014a (nfx C).
 Lane 4: wild strain No.6086.
 Lane 5: mutant (nfx A type) of No.6086.
 Lane 6: mutant (nfx B type) of No.6086.
 Lane 7: mutant (nfx C type) of No.6086.

膜タンパク質は同様であるが、分子量約 48 K~60 K Dalton の外膜タンパク質に種々の変化がみられた。同じ nfx C type でも標準株と臨床株では相違が認められた。この場合も nfx A type は外膜タンパク質が変化せず、nfx B type では同様なタンパク質の新生があったが、nfx C type では変化が一定でなかった。

III. 考 察

Norfloxacin に始まるニューキノロン剤は、広い抗菌スペクトルならびに優れた抗菌力を持ち、MRSA を含む耐性ブドウ球菌から緑膿菌にまで抗菌活性を有しており、抗緑膿菌作用を有する唯一の経口抗菌剤である。1984 年に norfloxacin が承認発表されて以来、年毎にニューキノロン剤の年間消費量が増加し続けており、さらに新しいキノロン剤も開発が続けられている。当院においてもピリドンカルボン酸系抗菌剤の購入量を見ると Fig. 5 に示すように、1985 年頃より NA, PPA に代わりニューキノロン剤の NFLX, OFLX の使用量が増加している。一方 1984 年には 1% しかなかった NFLX 耐性株が、1986 年、1987 年において著しい増加



Gunma University Hospital

NA: nalidixic acid, PPA pipemidic acid,
NFLX: norfloxacin, OFLX: ofloxacin, ENX: enoxacin

Fig. 5. Used quantities of pyridonecarboxylic acid agents

を示し、また感受性分布では三峰性を示し、明らかな耐性菌の峰が認められ、高度耐性菌の出現も認められている。したがってこれら耐性菌の出現は新薬の広汎な使用による選択蔓延の結果と考えられた。

血清型ではNFLX耐性株でも感受性株においても、同じようにB型、G型、分類不能型が多く、またフェージ型では、NFLX耐性株および感受性株のそれは共に多彩であり、型別不能株の多いのも同様であり、両者の型別で特定の型の増加がなかった。これらのことから、1986年以降耐性菌の増加が、院内感染の発生によるものではないと考えられた。

ピリドンカルボン酸系抗菌剤には、現在まで薬剤の不活化による耐性機構やプラスミドによって伝達される耐性機構は報告されていない。主な耐性機構は、染色体性の変異によるDNA gyraseのサブユニットAの変化によるものと、膜透過性の変化によるものとされている。前者の変異はnfx Aとして報告され、膜透過性の変化によるものにはnfx B, nfx C, nal Bなど異なる変異が報告されている⁶⁻⁸⁾。

臨床分離の感受性株を用いてNFLX耐性変異株を分離すると、標準株PAO株を用いた場合に得られた諸変異nfx A, nal B, nfx B, nfx Cと同様な薬剤感受性パターンを示すタイプを認めたが、それらとは異なるタイプも見いだされた。この既報と異なる株は今後の解析課題である。

種々の臨床株を用いた耐性変異ではnfx C typeの出現頻度が最も多かったが、他のタイプと出現頻度に

著しい相違はなかった。

nfx C typeはIPMおよびCPが共に感受性の低下を示すため、この結果から、今後NFLX耐性の増加と共にIPMに感受性の低下を示す菌株が蔓延する可能性が唆された。しかし現在我々が集めた臨床分離株の中では、NFLXとIPMとが共に耐性の株は1株しか認められなかった。

感受性株の外膜タンパク質の電気泳動においては、分子量約36 K Dalton以下のOmp F, G, Hに相当する外膜タンパク質においてはほとんどが同様なpatternであるが、分子量約48 K~60 K DaltonのOmp Dに相当する外膜タンパク質に関しては、主に2種類に分類され、1本のバンドを示すものと2本のバンドを示すものが認められた。しかし、それぞれの場合においても、外膜タンパク質の分子量には多少ずつの相違が認められ、菌株毎にOmp D相当のタンパク質は多様であった。

元株とその耐性変異株を比較すると、DNA gyraseの変化と考えられるnfx A typeの耐性変異株の外膜タンパクの泳動パターンは親株と同じであったが、膜透過性の変化による耐性変異株nal B, nfx B, nfx C typeではそれぞれに分子量約48 K~60 K Daltonのタンパク質に変化が認められた。nal Bおよびnfx B typeではそれぞれ約48 K, 約50~52 K Daltonのタンパク質の新生が認められたが、nfx C typeの場合は、外膜タンパク質の変化は複雑で新たに出現するものや減少ないし消失するもの等種々であった。

近年経口抗菌剤の中でニューキノロン剤の占める割合は著しく増加しているという報告¹¹⁻¹⁶⁾が多数ある。一方ニューキノロン剤の耐性菌も次第に増加しているという報告も多い。鈴木らの報告¹⁰⁾では複雑性尿路感染症におけるニューキノロン剤の繁用によって、緑膿菌の感受性低下、臨床効果の低下傾向が1987年より認められ、NFLXのMICが12.5 µg/ml以上の耐性菌の頻度が1980年に0%であったものが、1987年には59%に達していたという。また前田らの報告¹⁷⁾ではMIC₅₀が100 µg/ml以上であり、著明な耐性化が認められたという。上田¹⁸⁾によると、その耐性菌の頻度はMRSAが最も多く、次いで緑膿菌、セノチアの順であるという。

血清型およびフェージ型等の型別は院内感染の追求として有用であると報告されている¹⁹⁻²¹⁾。しかし今回NFLX耐性においては、院内感染を疑わせるものは認めなかった。NFLX耐性はプラスミドによる耐性の伝達は認めないため、それぞれの耐性菌はそれぞれ別の感受性菌より変異によって生じたと考えられた。

上田²²⁾によると、本系剤に対する細菌の耐性はNFLX耐性がプラスミドによって獲得されるものではなく、突然変異によるため、耐性菌は急増しないと推測しているし、Neuによれば本系剤は耐性が起こりにくい特性をもっているため、院内感染防止のうえで価値が高いとしている¹⁹⁾。しかし今回の結果より、耐性菌の出現増加は薬剤発売直後から始まっていることが認められるので、たとえ低頻度の突然変異の結果であっても、薬剤の多用、乱用では突然変異による耐性菌の出現増加、また高度耐性化を引き起こすことは避けられないと考えられる。そのため臨床における経口抗菌剤の使用に対して、今後の慎重な配慮が必要であると考えられる。

感受性株38株を用いた耐性変異株ではIPMおよびCPが共に感受性の低下を示すnfx C typeの頻度が最も多い結果から、今後NFLX耐性の増加と共にIPMの感受性の低下を示す菌株が蔓延する可能性が示唆された。しかし今回の臨床分離株の中に、NFLXとIPMとが共に耐性の株は1株しか認められなかった。これはnfx C typeといえども、臨床株のIPM耐性値が元来低いため、4倍程度の耐性値の上昇では、耐性株の限界値である12.5 µg/mlを超えるものが少ないためである。NFLX感受性臨床分離株を用いて分離した耐性変異株では菌株毎に種々のタイプのものが得られたが、標準株からの耐性変異株とは得られる頻度も外膜タンパク質の変化も異なっており、この間の関係はさらに解析中である。

臨床由来のNFLX耐性株について、薬剤感受性のパターンからNFLX耐性の諸タイプ別に分類すると、明らかにnfx A, nfx B, nfx C, nal B typeに属すると思われる菌株も認められる。しかし、プラスミド等の細胞質性遺伝子による影響などがあるため、すべてを明確に分類することは不可能である。また外膜タンパク質から検討することから、本来の外膜タンパク質のパターンが不明であるため、DNA gyraseの変化によるものか、膜透過性の変化によるものかを分けることは、困難である。

臨床分離株の耐性化に関する文献は少なく、Daikosら²³⁾は ciprofloxacin の治療の間に分離された耐性緑膿菌3株のうち2株に治療前の緑膿菌と比較し、31ないし32 K Daltonの外膜タンパク質の減少が認められたと報告し、この外膜タンパク質がキノロン剤の膜透過の機能的役割を果たしているといっている。しかしこの報告は他の諸耐性の変化との関連が不明であり、我々のデータとの比較は困難である。また膜透過性の変化による耐性が認められているIPMでは45ないし46 K Daltonの外膜タンパク質の減少を示唆する報告が認められる^{24,25)}。我々もIPMによる耐性変異株を分離しているが、その場合はNFLX耐性を伴わず、nfx C typeの変異とは異なる。膜透過性の変化には、選択に用いる薬剤毎に他の薬剤感受性の変化も、外膜タンパク質の変化する部位にもそれぞれ異なる特徴を認められる。しかし本実験にも認められるごとく、NFLX感受性菌株毎にOmp D相当外膜タンパク質は様々なものであっても、その耐性による変化はやはり約48 K~60 K Daltonの範囲のOmp Dの部位であった。NFLXの膜透過性による変化はこれらの外膜タンパク質が主体であると考えられた。

稿を終えるにあたり、御懇切なる御指導、御校閲を賜りました長町幸雄教授および橋本一教授に深甚なる謝意を表します。

なお、本論文の要旨は第35回北関東医学会総会および第37回日本化学療法学会総会において発表した。

本研究は昭和61年度文部省科学研究費一般研究B(課題番号61480142)の援助を受けた。

文 献

- 1) 塚田勝彦, 加藤広行, 長町幸雄, 伊豫部志津子, 橋本 一: 群馬大学付属病院にて分離された緑膿菌の検討. 北関東医学 38: 157~163, 1988
- 2) 塚田勝彦, 加藤広行, 長町幸雄, 伊豫部志津子, 橋本 一: 群馬大学付属病院由来の緑膿菌の薬剤耐性と血清型別. 北関東医学 38: 269~274, 1988
- 3) 加藤広行, 塚田勝彦, 長町幸雄, 伊豫部志津子, 橋本 一: 群馬大学付属病院にて分離された緑膿菌

- の検討—ファージ型別について—。感染症学雑誌 62: 938~943, 1988
- 4) 加藤広行, 長町幸雄, 橋本 一: 緑膿菌感染症, Medicament News, 第1252号: 2~4, 1989
 - 5) 最小発育濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
 - 6) Hirai K, Suzue S, Irikura T, Iyobe S, Mitsuhashi S: Mutations producing to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 582~586, 1987
 - 7) 平井敬二: キノロンカルボン酸系薬剤耐性。臨床と微生物 14: 135~142, 1987
 - 8) 福田秀行, 平井敬二, 入倉 勉, 伊豫部志津子, 三橋 進: 緑膿菌 PAO 株より分離した新しいタイプの NFLX 耐性変異株の性状について。日本細菌学雑誌 43: 469, 1988
 - 9) Poxton I R, Bell G T, Barclay G R: The association on SDS-polyacrylamide gels of lipopolysaccharide and outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* as revealed by monoclonal antibodies and Western blotting. FEMS. Microbiol. Lett. 27: 247~251, 1985
 - 10) Laemmli U K: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680~685, 1970
 - 11) 副島林造, 二木芳人, 渡辺正俊: 経口抗菌剤の現状と展望。ニューキノロン, P7~15, 東京, ライフ・サイエンス, 1989
 - 12) 福井了三, 須藤一郎, 海野勝男: 秋田大学医学部付属病院における抗生物質の使用状況。化学療法の領域 3: 729~736, 1987
 - 13) 木村浩三, 重松信夫: 福岡大学病院における抗生物質製剤の使用状況。化学療法の領域 3: 575~581, 1987
 - 14) 足立博一, 堀越 勇: 富山医科薬科大学付属病院における抗生物質の使用状況。化学療法の領域 3: 1714~1720, 1987
 - 15) 西村善行: 山口赤十字病院における化学療法剤の使用状況。化学療法の領域 3: 2125~2130, 1987
 - 16) 鈴木恵三, 長田恵弘, 名出頼男, 他: ニューキノロン系抗菌剤と複雑性尿路感染症における *P. aeruginosa* に対する効果の変遷。第22回緑膿菌研究会講演記録, 69~70, 1988
 - 17) 前田浩志, 中田勝久, 藤井 明, 他: 各抗緑膿菌剤に関する基礎的研究。第22回緑膿菌研究会講演記録, 82~85, 1988
 - 18) 上田 幸: 新キノロン剤の臨床。ライフ・サイエンス, 1988
 - 19) Bergan T, Kozaczek W: Epidemiological markers for *Pseudomonas aeruginosa*. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis 27: 447~458, 1979
 - 20) Rukmini D K, Bhaskaran C S: Comparison of Sero-aeruginocine-Phage typing of *Pseudomonas aeruginosa*. Indian J. Pathol. Microbiol. 27: 281~288, 1984
 - 21) Pencheva P: Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in Bulgaria using the Lanyi-Bergan combined scheme. Acta. Microbiologica Hungarica. 33: 345~349, 1986
 - 22) 上田 泰: 臨床からみたニューキノロン剤の現況。日本薬剤師会雑誌 39: 485~494, 1987
 - 23) Daikos G L, Lolans V T, Jackson G G: Alterations in outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* associated with selective resistance to quinolones. Antimicrob. Agents Chemother. 32: 758~787, 1988
 - 24) Buscher K H, Cullmann W, Dick W, Opferkuch W: Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* resulting from diminished expression of an outer membrane protein. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 703~708, 1987
 - 25) Buscher K H, Cullmann W, Dick W, Wendt S, Opferkuch W: Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is due to diminished expression of outer membrane proteins. J. Infect. Dis. 156: 681~684, 1987

NEW QUINOLONE RESISTANT MUTATION IN CLINICAL
ISOLATES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Hiroyuki Katoh, Hiroshi Tsuzuki¹⁾ and Shizuko Iyobe¹⁾

Department of Surgery 1, Gunma University School of Medicine,
3-39-22 Showa-cho, Maebashi, Gunma-ken, Japan

¹⁾ : Department of Microbiology, Gunma University School of Medicine

We investigated the susceptibility to norfloxacin (NFLX), and serotype and phage type of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. From NFLX sensitive strains we obtained NFLX-resistant mutants and demonstrated sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of outer membrane proteins of those strains.

1) Since 1986, NFLX-resistant *P. aeruginosa* strains have been increasing in Gunma University Hospital parallel with increasing use of NFLX.

2) Serotypes of both NFLX-resistant and -sensitive strains were B, G and non-typable, and their phage types mostly Hh8 (non-typable). There was no suspicion of nosocomial infection of NFLX resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

3) Four major types (nfx A, DNA gyrase type mutant; nfx B, nfx C and nal B, permeability type mutants) of NFLX-resistant mutants were obtained from drug-sensitive clinical isolates. Nfx C type mutants with concomitant IPM resistance were isolated easily, but the isolation frequency was similar to that of others.

4) Outer membrane proteins of NFLX-sensitive strains from clinical isolates showed a little difference between each other.

Nfx A type mutation did not show any change in outer membrane proteins. In nfx B type mutants, new 50 to 52 KD outer membrane proteins were detected. In nal B type new 48 KD protein appeared. Nfx C type mutants showed various patterns of appearance and disappearance of outer membrane proteins.