

【原著・基礎】

DNA gyrase 遺伝子が関与した *Klebsiella pneumoniae* の
キノロン薬耐性機作

安藤 慎一¹⁾・片山 知美¹⁾・早川 敏¹⁾・石川 清仁¹⁾・堀場 優樹¹⁾・柳岡 正範²⁾
星長 清隆¹⁾・鈴木 恵三¹⁾・庄内 真弓³⁾・吉田 博明³⁾・中村 信一³⁾・名出 頼男¹⁾

¹⁾ 藤田保健衛生大学医学部泌尿器科*

²⁾ 静岡赤十字病院泌尿器科

³⁾ 大日本製薬創業第2研究所

(平成8年6月20日受付・平成9年6月12日受理)

尿路感染症由来および腸内細菌叢由来 *Klebsiella pneumoniae* のキノロン薬耐性化率が近年漸増しており、1994年分離株の中にはノルフロキサシンのMICが100 µg/ml以上の耐性株も見出された。*gyrA* 遺伝子上のキノロン薬耐性決定領域に相当する部分を含む329 bpのDNA断片をPCRにより増幅し、Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) 法を用いて解析したところ、調べた20株は5種類のパターンに分類された。これらDNA断片の塩基配列決定の結果、20株中16株は*gyrA* 変異株であり、SSCPパターンが同一のものは同一の*gyrA* 変異を有していた。見出された変異は、Ser-83 (TCC)→Phe (TTC) (6株)、Asp-87 (GAC)→Gly (GGC) (1株)、Ser-83 (TCC)→Leu (TTG) + Asp-87 (GAC)→Asn (AAC) (1株) および Ser-83 (TCC)→Phe (TTC) + Asp-87 (GAC)→Asn (AAC) (8株)であった。調べた耐性株のうち3株については野生型*gyrA* 遺伝子による形質転換によりキノロン薬感受性化したことから、*gyrA* 変異が耐性の原因であることが確認された。

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, キノロン薬耐性, *gyrA* 変異

現在、臨床上でキノロン薬耐性菌が多く認められている。その菌種もグラム陰性桿菌群¹⁻⁶⁾、ブドウ球菌属⁷⁻¹¹⁾、淋菌^{12,13)} などさまざまである。これらのキノロン薬耐性機構は、DNA ジャイレースのサブユニットAをコードしている*gyrA* 遺伝子の、キノロン薬耐性決定領域中の点変異によることが多いと報告されている。我々は、近年、尿路感染症より分離された*Klebsiella pneumoniae* では、大腸菌に比してキノロン薬耐性株が多い印象をもち、特に慢性尿路感染に対するキノロン薬使用で考慮すべき問題と考えている。しかし、その耐性機構についての報告はなく、キノロン薬感受性株の*gyrA* 遺伝子の塩基配列の報告¹⁴⁾があるのみである。

本論文では、尿路感染症由来および腸内細菌叢由来 *K. pneumoniae* でのキノロン薬耐性メカニズムについて、Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) および *gyrA* 遺伝子キノロン薬耐性決定領域の塩基配列決定による検討を行い、さらに耐性株(3株)については野生型 *gyrA* 遺伝子による薬剤感受性化試験を行ったので報告する。

I. 材料と方法

1. 対象菌株

藤田保健衛生大学病院泌尿器科において1988年に尿より分離された *K. pneumoniae* A, D 株と、1991年に糞便より分離された M, N, O, P, R, S 株および1994年

に尿より分離された63株、計71株を使用した。

2. MIC 測定

日本化学療法学会標準寒天平板希釈法¹⁵⁾を用いて力価の明らかな norfloxacin (NFLX, 杏林製薬), ciprofloxacin (CPFX, バイエル薬品), sparfloxacin (SPFX, 大日本製薬), levofloxacin (LVFX, 第一製薬), pazufloxacin (PZFX, 富山化学), ceftazidime (CAZ, 日本グラクソ) のMICを測定した。

3. PCR

菌株をL-ブロスにて37℃18時間振とう培養し、100 µlの菌液を遠心集菌後、蒸留水(0.1 ml)に懸濁し、99℃、5分加熱してDNAを抽出した。4℃で10,000×g、10分間遠心し、上清をテンプレートとしてPCRに供した。PCR用オリゴヌクレオチドプライマーは、*K. pneumoniae gyrA* 遺伝子¹⁴⁾の中で、大腸菌のキノロン薬耐性決定領域に相当する329 bp断片を増幅するように、KGA-1: 5'-ATGTCCGAGATGGCCTGAAG-3' (塩基番号107-126)ならびにKGA-2: 5'-GAAATC-GACCGTCTCTTTTT-3' (塩基番号435-416)を用いた。反応液(50 µl)中の各試薬終濃度を10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM d-NTP に調製し、テンプレートDNA 5 µl, 2.5 U

Taq DNA polymerase (宝酒造) およびプライマー (0.1 μ M) を加え、DNA thermal cycler (Perkin Elmer Cetus) にて 94 $^{\circ}$ C, 30 秒, 55 $^{\circ}$ C, 30 秒, 72 $^{\circ}$ C, 2 分の反応を 30 サイクル行った。

4. SSCP

上記のようにして得た PCR 産物 5 μ l に対して, 10 μ l の 0.1 % bromophenol blue, 0.1 % xylenecyanol FF, 20 mM EDTA を含む 95 % formamide 溶液を加え, 80 $^{\circ}$ C, 10 分間変性した後, 5 μ l を 10 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (25 mM Tris-192 mM glycine, pH 8.3 緩衝液で 16 $^{\circ}$ C, 100 V, 2 時間) に供し, 銀染色した。

5. 塩基配列決定

PCR 産物を SUPREC-02 (宝酒造) で精製後, pT 7 Blue (R) T ベクター (Novagen) にクローニングして一本鎖 DNA を調製後, ジデオキシ法¹⁶⁾ により塩基配列の決定を行った。

6. 形質転換

野生型大腸菌 KL 16 株の *gyrA* および *gyrB* 遺伝子を各々 broad host range plasmid pKT 240¹⁷⁾ にクローン化した。*gyrA* の場合は, 大腸菌野生型 *gyrA* 遺伝子を含む 4.5 kb *Stu* I -*Spl* I 断片¹⁸⁾ を平滑化後, pKT 240 の *Hpa* I 部位に挿入し, プラスミド pKT 240 ECGA を構築した。pKT 240 ECGB は大腸菌野生型 *gyrB* 遺伝子を含む 3.6 kb *Ssp* I -*Bal* I 断片¹⁹⁾ を pKT 240 の *Hpa* I 部位に挿入したものである。これら 2 種類のプラスミドにより *K. pneumoniae* D, 36, 80 株の形質転換を CaCl_2 法により行い, 各形質転換体の NFLX に対する感受性が認められるか否かを検討した。

II. 結 果

1. 臨床分離 *K. pneumoniae* の薬剤感受性

Table 1 に 1988 年, 1991 年分離株での各抗菌薬の MIC 値と, 1994 年尿中分離 63 株の MIC₅₀ および MIC₉₀ を示す。いずれの年の分離株からもキノロン薬耐

性株が検出されたが, 1988 年および 1991 年分離株中には低度耐性株 (NFLX の MIC 0.2~0.78 μ g/ml) と中等度耐性株 (NFLX の MIC 3.13~12.5 μ g/ml) が認められた。1994 年分離株の MIC₅₀ は \leq 0.025~0.2 μ g/ml, MIC₉₀ は 25~50 μ g/ml に分布しており, 低度耐性株が多く認められたが, 高度耐性株 (NFLX の MIC が 50 μ g/ml 以上の株が 9 株 (14.3 %) 散見された。また, CAZ に対する低感受性株は 1994 年分離株中 2 株 (3.2 %) が認められた。

2. キノロン薬高度耐性株 *gyrA* 遺伝子の SSCP 法による分類

キノロン薬高度耐性 *K. pneumoniae* 株 9 株 (5, 11, 36, 43, 49, 55, 80, 82, 83), 中等度耐性株 5 株 (D, N, R, 28, 46), 低度耐性株 4 株 (A, O, P, 89) および感受性株 2 株 (M, S), 計 20 株について DNA ジャイレース *gyrA* 遺伝子上の変異の有無を調べるため, 大腸菌のキノロン薬耐性決定領域に相当する領域を含む PCR 断片の SSCP を行い, 電気泳動パターンを調べた。Fig. 1 に示すように, 耐性株は 4 つのパターン (type II, type III, type IV および type V) に分類された。

3. *K. pneumoniae gyrA* 遺伝子断片の塩基配列

SSCP 法で解析した耐性株 16 株ならびに感受性株 4 株すべてについて, PCR で得た *gyrA* 遺伝子断片の塩基配列を決定した。感受性株 2 株 (M, S) と低度耐性株 2 株 (O, P) の *gyrA* 断片の塩基配列 (GSDB, DDBJ, EMBL, および NCBI データベースへの登録番号 D50059) は, Dimri と Das¹⁴⁾ により報告されている野生型株の配列と比較すると, 塩基レベルで 91 %, アミノ酸レベルで 96 % の相同性が認められた。また, これらの株の SSCP パターンはいずれも I 型であった。低度耐性株 2 株 (A, 89), 中等度耐性株 4 株 (D, N, 28, 46) では Ser 83 (TCC) \rightarrow Phe (TTC) 変異が見出され, SSCP パターンは II 型であった。中等度耐性

Table 1. Susceptibilities of *Klebsiella pneumoniae*

Strain	MIC (μ g/ml)					
	NFLX	CPFX	SPFX	LVFX	PZFX	CAZ
A	0.78	0.39	0.39	0.39	0.2	1.56
D	12.5	6.25	6.25	6.25	3.13	3.13
M	0.05	\leq 0.025	0.05	0.05	\leq 0.025	0.39
N	3.13	0.78	0.78	0.78	0.39	1.56
O	0.2	0.1	0.1	0.1	0.05	0.78
P	0.39	0.1	0.1	0.2	0.05	0.78
R	6.25	6.25	6.25	6.25	3.13	3.13
S	0.05	0.05	0.05	0.1	\leq 0.025	0.39

'94 strains (n=63)						
MIC ₅₀ (μ g/ml)	0.2	0.05	0.1	0.1	\leq 0.025	0.39
MIC ₉₀ (μ g/ml)	50	50	50	50	25	1.56

NFLX: norfloxacin, CPFX: ciprofloxacin, SPFX: sparfloxacin, LVFX: levofloxacin, PZFX: pazufloxacin, CAZ: ceftazidime

株 1 株 (R) 株では Asp-87 (GAC) → Gly (GGC) の変異が認められ, SSCP パターンは III 型であった。高度耐性株 43 (SSCP パターン IV 型) では Ser-83 (TCC) → Leu (TTG) と Asp-87 (GAC) → Asn (AAC) の二重

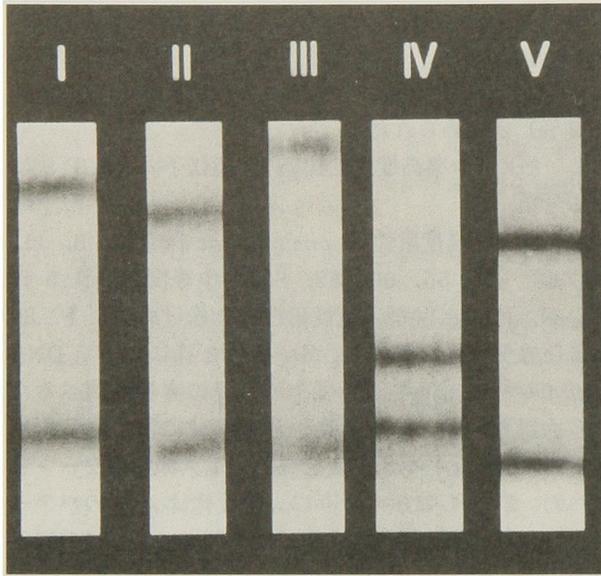


Fig. 1. Detection of *gyrA* mutation by SSCP analysis
Lanes: lane I, wild-type; lane II, mutant with Ser-83 (TCC) → Phe (TTC); lane III, mutant with Asp-87 (GAC) → Gly (GGC); lane IV, mutant with Ser-83 (TCC) → Leu (TTG) and Asp-87 (GAC) → Asn (AAC) with silent mutations; lane V, mutant with Ser-83 (TCC) → Phe (TTC) and Asp-87 (GAC) → Asn (AAC).

変異の他に, Val-85 (GTA → GTC), Tyr-86 (TAC → TAT), Thr-88 (ACC → ACG) の silent mutation が認められた。高度耐性株 8 株 (5, 11, 36, 49, 55, 80, 82, 83) では Ser-83 (TCC) → Phe (TTC) と Asp-87 (GAC) → Asn (AAC) の二重変異が認められ, SSCP パターンは V 型であった (Table 2)。

これらはいずれも大腸菌, 黄色ブドウ球菌などでキノロン薬耐性を惹起する変異として見出されている変異, あるいはそれらに対応する部位の変異であり, これらの変異がキノロン薬耐性に関与していることが推察された。

4. キノロン薬耐性 *K. pneumoniae* 株の野生型大腸菌 *gyrA*, *gyrB* 遺伝子によるキノロン薬感受性化

D, 36, 80 株の大腸菌野生型 *gyrA* 遺伝子による形質転換体は NFLX に D が 8 倍, 36, 80 は 16 倍感受性化した。野生型 *gyrB* 遺伝子は, この耐性株のキノロン薬感受性に影響を与えなかった。したがって, D, 36, 80 株は *gyrA* 変異によりキノロン薬耐性化していることが判明した。しかし, *gyrA* 形質転換体は感受性株に比べてキノロン薬に低度耐性であることから, D, 36, 80 株は *gyrA* 変異以外の変異もあわせて持っている可能性があることが推察された (Table 3)。

III. 考 察

尿路感染症領域では起因菌としてもっとも多く分離されるのは大腸菌である。キノロン薬耐性機構の研究報告も大腸菌によるものが多い。しかしながら, *K.*

Table 2. Quinolone-resistant mutations in the *gyrA* gene of *Klebsiella pneumoniae*

No.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					Mutations in the <i>gyrA</i> gene	SSCP type
	NFLX	CPFX	SPFX	LVFX	PZFX		
A	0.78	0.39	0.39	0.39	0.2	Ser-83 (TCC) → Phe (TTC)	II
D	12.5	6.25	6.25	6.25	3.13	Ser-83 (TCC) → Phe (TTC)	II
N	3.13	0.78	0.78	0.78	0.39	Ser-83 (TCC) → Phe (TTC)	II
R	6.25	6.25	6.25	6.25	3.13	Asp-87 (GAC) → Gly (GGC)	III
M	0.05	≤0.025	0.05	0.05	≤0.025	None	I
O	0.2	0.1	0.1	0.1	0.05	None	I
P	0.39	0.1	0.1	0.2	0.05	None	I
S	0.05	0.05	0.05	0.1	≤0.025	None	I
5	100	50	100	100	25	Ser-83 (TCC) → Phe (TTC), Asp-87 (GAC) → Asn (AAC)	V
11	100	50	50	50	25	Ser-83 (TCC) → Phe (TTC), Asp-87 (GAC) → Asn (AAC)	V
28	1.56	0.39	0.78	0.78	0.39	Ser-83 (TCC) → Phe (TTC)	II
36	>100	50	50	50	25	Ser-83 (TCC) → Phe (TTC), Asp-87 (GAC) → Asn (AAC)	V
43*	50	12.5	25	12.5	6.25	Ser-83 (TCC) → Leu (TTG), Asp-87 (GAC) → Asn (AAC)	IV
46	1.56	0.2	0.39	0.39	0.2	Ser-83 (TCC) → Phe (TTC)	II
49	100	50	50	50	12.5	Ser-83 (TCC) → Phe (TTC), Asp-87 (GAC) → Asn (AAC)	V
55	100	50	50	50	25	Ser-83 (TCC) → Phe (TTC), Asp-87 (GAC) → Asn (AAC)	V
80	>100	50	100	100	25	Ser-83 (TCC) → Phe (TTC), Asp-87 (GAC) → Asn (AAC)	V
82	>100	50	100	100	25	Ser-83 (TCC) → Phe (TTC), Asp-87 (GAC) → Asn (AAC)	V
83	100	50	50	50	25	Ser-83 (TCC) → Phe (TTC), Asp-87 (GAC) → Asn (AAC)	V
89	0.78	0.2	0.39	0.39	0.2	Ser-83 (TCC) → Phe (TTC)	II

*43 with silent mutations [Val-85 (GTA → GTC), Tyr-86 (TAC → TAT), Thr-88 (ACC → ACG)].

NFLX: norfloxacin, CPFX: ciprofloxacin, SPFX: sparfloxacin, LVFX: levofloxacin, PZFX: pazufloxacin

Table 3. Susceptibilities of *Klebsiella pneumoniae* D, 36, 80 transformants

Strain	Plasmid with	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
		NA	NFLX
<i>K. pneumoniae</i> D	—	>400	12.5
	pKT 240 ECGA ^a	50	1.56
	pKT 240 ECGB ^b	>400	12.5
<i>K. pneumoniae</i> 36	—		200
	pKT 240 ECGA ^a		12.5
<i>K. pneumoniae</i> 80	—		200
	pKT 240 ECGA ^a		12.5

^aA plasmid having the wild-type *E. coli* KL16 *gyrA* gene.

^bA plasmid having the wild-type *E. coli* KL16 *gyrB* gene.

NA: nalidixic acid, NFLX: norfloxacin

pneumoniae は臨床上でキノロン薬耐性株が大腸菌より多く認められるという報告¹⁹⁾があり、我々の施設においても 1988 年以降キノロン薬耐性 *K. pneumoniae* が漸増している。1994 年に分離された 63 株の中には、NFLX の MIC が 50 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示した高度耐性株が 9 株 (14.3 %) あり、耐性度も上昇してきている。そこで今回、若干の菌株のキノロン薬耐性メカニズムを *gyrA* 変異の面から調べた。今回調べた臨床分離株 20 株での *gyrA* 遺伝子断片の SSCP 泳動パターンは、5 種類に分類された。SSCP パターンの同一のものは同一の *gyrA* 変異を有することが塩基配列決定から明らかになり、SSCP type I: 未変異, type II: Ser-83→Phe, type III: Asp-87→Gly, type IV: Ser-83→Leu + Asp-87→Asn, type V: Ser-83→Phe + Asp-87→Asn であった。したがって、SSCP のパターンから、*K. pneumoniae* 株の *gyrA* 遺伝子上の変異を推定することが可能と思われた。

gyrA 遺伝子上の変異は、塩基配列決定を行った 20 株中 Ser-83(TCC)→Phe(TTC)変異を有する株が 14 株と最も多く、次いで Asp-87(GAG)→Asn(AAC) が 9 株、Asp-87(GAC)→Gly(GGC), Ser-83(TCC)→Leu(TTG) の変異が各 1 株で確認された。これらの変異は、大腸菌や黄色ブドウ球菌、淋菌、表皮ブドウ球菌などで報告されているキノロン薬耐性変異に対応するものと考えられることから、*K. pneumoniae* でもこれらの変異がキノロン薬耐性と深く関わっている可能性もある。

キノロン薬耐性度は Ser-83→Phe + Asp-87→Asn 変異の場合がもっとも高く、次いで Ser-83→Leu + Asp-87→Asn 変異, Asp-87→Gly 変異, Ser-83→Phe 変異の順に耐性度が低下する傾向にあった。*gyrA* 遺伝子上の変異とキノロン薬耐性度の関連性については、調べた株が *gyrA* 以外の変異をあわせ持つ可能性があることから明確には言えないが、他菌種^{3, 11, 20, 21)}と同様に

gyrA の Ser-83 の変異が耐性化に重要で、さらに Asp-87 の変異が加わることによって高度耐性化していると推測された。

我々が 1988 年に分離した 2 株 (A と D) は同一慢性膀胱炎患者尿から分離された株であり、A の分離後 34 日目に D が分離された。両者の生物学的性状は同一であり、NFLX の MIC は A が 0.78 $\mu\text{g/ml}$, D は 12.5 $\mu\text{g/ml}$ と 16 倍の差が認められた。A の分離後 NFLX 投与による治療がなされた後に D が分離されたが、塩基配列の決定から、両株ともに *gyrA* 遺伝子上の Ser-83→Phe 変異を有しており、治療前にすでにこの *gyrA* 変異を獲得してキノロン薬に若干耐性化していたことが判明した。おそらく *gyrA* 変異を有する *K. pneumoniae* A 株で感染が起こり、キノロン薬投与により、さらに耐性度の高くなった D 株が出現したと推測される。D 株での *gyrA* 変異以外の遺伝子変異については不明であるが、*gyrB* 遺伝子上の変異の可能性は、野生型 *gyrB* 遺伝子を用いたキノロン薬感受性化試験の結果から否定される。¹⁴C-enoxacin での菌体内取り込みを測定したところ、反応 10 分後での菌体内 enoxacin 量は D 株では A 株の 31 % に低下しており、CCCP 存在下では両株の enoxacin の取り込み量が同じであったことから (データ未提示), D 株でキノロン薬排出が亢進していたことが推察された。両株の outer membrane protein の検索を行ったところ、D 株の約 45 kDa 付近 fragment が A 株とは異なる点が認められ (データ未提示), D 株のこの outer membrane protein が、キノロン薬の排出亢進に関与している可能性もあり現在検討中である。

近年、我が国では感染症に対してキノロン薬がよく用いられており、耐性菌の出現が問題にされているが、*K. pneumoniae* でも *gyrA* 変異により耐性化した株の多いことが判明した。今後のキノロン薬使用はこれらのことを熟知して慎重に行うべきであると考えられた。

本論文の一部は第 42, 43 回日本化学療法学会西日本支部総会 (1994 年 12 月名古屋市および 1995 年 12 月 宜野湾市) にて発表した。

文 献

- 1) Yamagishi J, Yoshida H, Yamayoshi M, et al.: Nalidixic acid-resistant mutations of the *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 204: 367~373, 1986
- 2) Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, et al.: Quinolone resistance determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1271~1272, 1990
- 3) Oram M, Fisher M: 4-quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 387~

- 389, 1991
- 4) Kureishi A, Diver J M, Beckthold B, et al.: Cloning and nucleotide sequence *Pseudomonas aeruginosa* DNA gyrase *gyrA* gene from strain PAO1 and quinolone-resistant clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1944~1952, 1994
 - 5) Oppegaard H, Sorum H: *gyrA* mutation in quinolone-resistant isolates of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2460~2464, 1994
 - 6) Rahman M, Mauff G, Levy J, et al.: Detection of 4-quinolone resistance mutation in *gyrA* gene of *Shigella dysenteriae* type 1 by PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2488~2491, 1994
 - 7) Goswitz J J, Willard K E, Fasching C E, et al.: Detection of *gyrA* gene mutations associated with ciprofloxacin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Analysis by polymerase chain reaction and automated direct DNA sequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 1166~1169, 1992
 - 8) Fasching C E, Tenover F C, Slama T G: *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Indiana, Minnesota, and Tennessee. *J Infect Dis.* 164: 976~979, 1991
 - 9) Sreedharan S, Oram M, Jensen B, et al.: DNA gyrase *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*: close similarity with quinolone resistance mutations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 172: 7260~7262, 1990
 - 10) Sreedharan S, Peterson L R, Fisher L M: Ciprofloxacin resistance in coagulase-positive and -negative staphylococci: role of mutations at serine 84 in the DNA gyrase A protein of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 2151~2154, 1991
 - 11) Tokue Y, Sugano K, Saito D, et al.: Detection of novel mutation in the *gyrA* gene of *Staphylococcus aureus* by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis and direct DNA sequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 428~431, 1994
 - 12) Belland R J, Morrison A G, Ison C, et al.: *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *parC* in fluoroquinolone-resistant isolates. *Molecular Microbiology* 14: 371~380, 1994
 - 13) 小野寺昭一, 岸本幸一, 柴田 浩, 他: ニューキノロン薬耐性淋菌の耐性機構の解析. *感染症学雑誌* 69: 511~516, 1995
 - 14) Dimri G P, Das H K: Cloning and sequence analysis of *gyrA* gene of *Klebsiella pneumoniae*. *Nucl. Acids Res.* 18: 151~156, 1990
 - 15) 最少発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について. *Jpn. J. Chemother.* 29: 76~79, 1981
 - 16) Sanger F, Coulson A R, Barrel B G, et al.: Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J. Mol. Biol.* 143: 161~178, 1980
 - 17) Bagdasarian M M, Amann E, Lurz R, et al.: Activity of the hybrid *trp-lac (tac)* promoter of *Escherichia coli* in *Pseudomonas putida*. Construction of broad-host-range, controlled-expression vectors. *Gene* 26: 273~282, 1983
 - 18) Yoshida H, Kojima T, Yamagishi J, et al.: Quinolone-resistant mutations of the *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 211: 1~7, 1988
 - 19) 熊澤浄一, 松本哲朗: 高齢者尿路感染症の起炎菌に関する全国調査, 第 2 報: 経口抗菌薬に対する起炎菌の感受性について. *感染症学雑誌* 69: 797~810, 1995
 - 20) Heisig P, Schedletzky H, Falkenstein P: Mutation in *gyrA* gene of highly fluoroquinolone resistant clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 696~701, 1993
 - 21) Vila J, Ruiz J, Marco F, et al.: Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2477~2479, 1994

Quinolone resistance mutations in *Klebsiella pneumoniae*

Shinichi Ando¹⁾, Tomomi Katayama¹⁾, Satoshi Hayakawa¹⁾, Kiyohito Ishikawa¹⁾,
Masaki Horiba¹⁾, Masanori Yanaoka²⁾, Kiyotaka Hoshinaga¹⁾, Keizo Suzuki¹⁾,
Mayumi Shonai³⁾, Hiroaki Yoshida³⁾, Shinichi Nakamura³⁾ and Yorio Naide¹⁾

¹⁾Department of Urology, Fujita Health University School of Medicine, 1-98 Kutsukake
Denrakugakubo, Toyoake, Aichi 470-11, Japan

²⁾Department of Urology, Shizuoka Red-Cross Hospital

³⁾Bioscience Research Laboratories, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.

Single-strand conformational polymorphism (SSCP) analysis of 20 quinolone-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* showed five mobility patterns. DNA sequence analysis of these fragments revealed that DNA fragments with a mutation (s) in the *gyrA* gene showed different patterns from the pattern of the wild type *gyrA* fragment and that one mutation group yielded the specific mobility pattern, which enabled us to anticipate the mutation (s) in the *gyrA* gene by SSCP analysis. When transformed with the wild type *Escherichia coli gyrA* gene, the mutants tested became quinolone susceptible, suggesting that the *gyrA* mutations are responsible for quinolone resistance.