

【原著・臨床】

尿由来緑膿菌における *gyrA* 遺伝子変異の臨床的意義に関する研究

河田 幸道・出口 隆・仲野 正博・安田 満

岐阜大学医学部泌尿器科*

(平成9年5月6日受付・平成9年7月18日受理)

尿由来 *Pseudomonas aeruginosa* の ofloxacin (OFLX) 感受性の年次変遷を検討するとともに、臨床経過の明確な症例から分離された *P. aeruginosa* について *gyrA* 遺伝子変異の有無を検討し、変異の頻度、変異と MIC との関係、変異と臨床効果との関係を検討することにより、尿由来ニューキノロン耐性 *P. aeruginosa* における *gyrA* 遺伝子変異の臨床的意義について検討した。OFLX の MIC 25 $\mu\text{g/ml}$ 以上を耐性と考えると、耐性株の頻度は 1988～1993 年までは年々増加し、1992～1993 年分離株では 58.6% まで達したが、1994～1995 年分離株では 36.6% に低下していた。*gyrA* 遺伝子変異は投薬前分離株では 47 株中 27 株 (57.4%)、投薬後分離株では 30 株全株に認められた。また、OFLX の MIC との関係では、MIC が 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下の株では 21 株中 1 株 (4.8%) のみであったが、MIC が 25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の 32 株では全株に変異が認められ、MIC が 200 $\mu\text{g/ml}$ 以上になると重複変異株が出現した。ニューキノロン薬を 5～7 日間投与して治療を行った 47 例中、変異を認めない 20 株では 18 株 (90.0%) までが消失したが、変異を認めた 27 株では 3 株 (11.1%) の消失にとどまり、この間に有意差が認められた ($p < 0.01$)。複雑性尿路感染症から分離された *P. aeruginosa* に対する OFLX の細菌学的ならびに臨床的な MIC のブレイクポイントは 12.5 $\mu\text{g/ml}$ にあり、*gyrA* 遺伝子変異の発現もこの濃度と一致していることから、尿由来 *P. aeruginosa* のキノロン耐性機序としては *gyrA* 遺伝子変異が臨床的に重要と考えられた。

Key words: 緑膿菌, *gyrA* 遺伝子変異, キノロン耐性, 尿路感染症

ニューキノロン薬は尿路感染菌の大部分をカバーする幅広い抗菌スペクトルと強い抗菌力を示し、臨床効果も優れていることから尿路感染症の治療に繁用されている。しかし一方では、繁用ともなう耐性菌の出現が問題となりつつあり、特に *Pseudomonas aeruginosa* の耐性化が顕著である。

P. aeruginosa のキノロン耐性機序としては、標的酵素である DNA ジャイレースの変化と菌体内透過性の変化が知られており¹⁻³⁾、DNA ジャイレースについては、これを作る *gyrA* 遺伝子の変異が報告されている^{4,5)}。しかし、尿由来 *P. aeruginosa* において、どの程度の頻度で *gyrA* 遺伝子変異がおきているか、また治療との関係においてどのような臨床的意義があるかについては明確でない。

そこで著者らは、尿由来 *P. aeruginosa* の ofloxacin (OFLX) 感受性の年次変遷を検討するとともに、臨床経過の明確な症例から分離された *P. aeruginosa* について *gyrA* 遺伝子変異の有無を検討し、変異の頻度、変異と MIC との関係、また変異の有無とニューキノロン薬の臨床効果との関係を検討することにより、ニューキノロン耐性 *P. aeruginosa* における *gyrA* 遺伝子変異の臨床的意義について検討を行った。

I. 対象および方法

1. Ofloxacin 感受性の年次変遷

複雑性尿路感染症患者の尿から分離され、教室に保存されていた *P. aeruginosa* 412 株に対する OFLX の MIC を、日本化学療法学会標準法⁶⁾により測定した。保存株は 1978 年に分離された 51 株と、1988 年～1995 年の 8 年間に分離された 361 株である。

2. *gyrA* 遺伝子変異の検出

複雑性尿路感染症に対して OFLX 1 日 600 mg (分 3)、levofloxacin (LVFX) 1 日 300 mg (分 3) または AM-1155 (AM) 1 日 200 mg, 300 mg または 400 mg (いずれも分 2) を 5～7 日間投薬し、その臨床経過が明確な 53 例の投薬前に分離された *P. aeruginosa* 47 株および投薬後に分離された 30 株について、*gyrA* 遺伝子のキノロン耐性決定領域にある Thr-83 および Asp-87 のコドン内に変異があるか否かを検討した。

gyrA 遺伝子変異の検出には、PCR による遺伝子増幅と制限酵素による切断を組み合わせた⁷⁾簡易検出法を開発し、これを用いて行った。すなわち、Fig. 1 に示すように、センス側プライマーとして Thr-83 コドンより上流に PS-GYR-A を、アンチセンス側プライマーとして

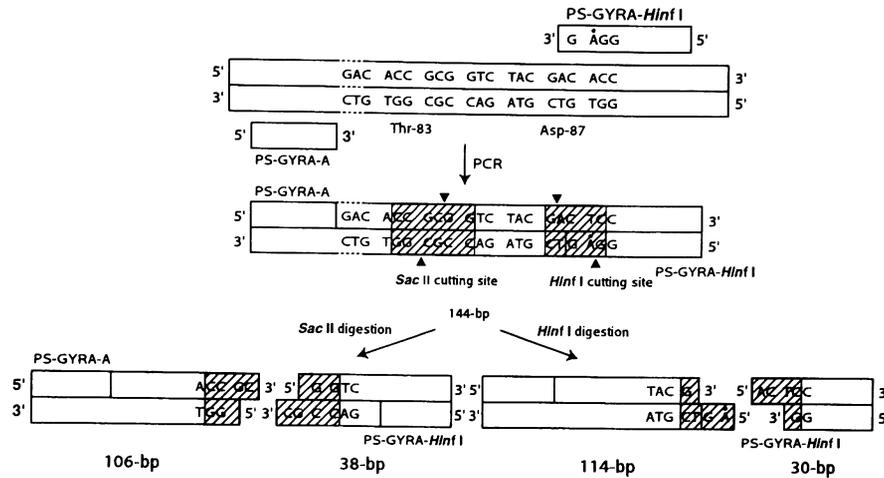


Fig. 1. Rapid screening for point mutations in the *Pseudomonas aeruginosa gyrA* gene associated with quinolone resistance. Triangles (▲) indicate a mismatched base.

Asp-87 のコドン下流側に隣接するように mismatches の 1 塩基を含む PS-GYR-A-*HinfI* を作成した。これらのプライマーを用いた PCR の遺伝子増幅により、野生型の *gyrA* 遺伝子からは Thr-83 のコドンを含む制限酵素 *Sac* II の切断部位と、PS-GYR-A-*HinfI* により人工的に導入された Asp-87 のコドンを含む制限酵素 *HinfI* の切断部位が 144 塩基対の PCR 産物上に作成されるようにした。

これにより Thr-83 のコドンに変異がなければ、*Sac* II により 144 塩基対の断片は 106 塩基対と 38 塩基対の 2 個の断片に切断され、また Asp-87 のコドンに変異がなければ *HinfI* により 114 塩基対と 30 塩基対の断片に切断される。一方、キノロン耐性に関連する変異がこれらのコドン内に存在する場合には、制限酵素による切断は認められない。これらの *gyrA* 遺伝子変異の有無を検討した 77 株に対する OFLX の MIC も測定し、*gyrA* 遺伝子変異の有無と MIC との関係も検討した。

3. 臨床的検討

gyrA 遺伝子変異の検討を行った 77 株の *P. aeruginosa* が分離された 53 例について、カテーテル留置の有無、ニューキノロン薬服薬の既往などの患者背景因子と *gyrA* 遺伝子変異の有無、またニューキノロン薬の臨床効果が判定可能であった 47 例について、臨床効果と *gyrA* 遺伝子変異との関係について検討した。臨床効

果は UTI 薬効評価基準 (第 3 版)⁸⁾ に従い、*P. aeruginosa* に対する細菌学的効果を判定した。細菌学的効果が存続と判定された症例については、投薬前後に分離された *P. aeruginosa* が同一株であるか否かを、arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) 法⁹⁾ を用いて検討した。

II. 結 果

1. Ofloxacin 感受性の年次変遷

複雑性尿路感染症により分離された *P. aeruginosa* 412 株に対する OFLX の MIC を年次別に検討した成績を Table 1 に示す。1978 年に分離された 51 株は単年度で、1988 年～1995 年の 8 年間に分離された 361 株は 2 年毎にまとめて集計したが、MIC₅₀ は 1993 年までは次第に高くなり、また MIC が 25 μg/ml 以上の株が占める頻度も 1993 年まで次第に増加していた。しかし、1994 年～1995 年に分離された 71 株では、MIC₅₀ および MIC が 25 μg/ml 以上の株の頻度ともに低下していた。

2. *gyrA* 遺伝子変異の頻度

今回用いた検出法により、標準株 *P. aeruginosa* ATCC 10145 を含む 6 株から *gyrA* 遺伝子を検出した例を Fig. 2 に示す。

Sac II による切断では標準株 (T)、PA-4 株 (4) および PA-5 株 (5) では 144 塩基対の DNA 断片の切断が認められるが、PA-3 株 (3)、PA-7 株 (7) および

Table 1. MICs of ofloxacin for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Year	No. of strains	MIC range (μg/ml)	MIC ₅₀	MIC ₉₀	% of strains with MIC ≥ 25 μg/ml
1978	51	0.20~>100	3.13	25	11.8
1988~1989	146	0.10~>100	12.5	>100	48.6
1990~1991	86	0.39~>100	25	>100	53.6
1992~1993	58	0.39~>100	50	>100	58.6
1994~1995	71	0.10~>100	6.25	>100	36.6



Fig. 2. Detection of point mutations in the *Pseudomonas aeruginosa gyrA* gene by restriction enzyme analysis. M: marker, C: control without digestion, T: type strain, 3, 4, 5, 7, 13: strain No. of clinically isolated *P. aeruginosa*.

PA-13 株 (13) の 3 株では制限酵素未処理の 144 塩基対の PCR 産物 (C) と同等の DNA 断片が認められており, *Sac* II により切断されないことから, この 3 株には Thr-83 コドン内に変異があると判定した。

また *Hinf* I による切断では, T, 3, 4, 7 では切断が認められるが, 5 と 13 の 2 株では切断されず, この 2 株には Asp-87 コドン内に変異があると判定した。すなわち, 3 と 7 には Thr-83 コドン内に単独変異が, 5 には Asp-87 コドン内に単独変異が, 13 には両部位に重複変異があると判定し, T と 4 には変異はないと判定した。

このようにして, 今回対象とした 53 例の投薬前に分離された 47 株について変異の有無をみると, 変異を認めない株が 20 株 (42.6%), 単独変異株が 23 株 (48.9%), 重複変異株が 4 株 (8.5%) であり, 結局, 変異を認める株が 47 株中 27 株 (57.4%) と過半数を占めた。変異の部位は Thr-83 コドン内の単独変異が 22 株 (81.5%) ともっとも多く, Asp-87 コドン内の単独変異は 1 株 (3.7%) のみであり, 両部位の重複変異は 4 株 (14.8%) であった。一方, 投薬後に分離された 30 株の内訳は存続株が 27 株, 投薬後出現株が 3 株であったが, 全株に変異が認められ, このうち 4 株 (13.3%) は重複変異株であった。変異株が分離された症例の背景因子を調査したところ, カテーテル留置症

例から分離された 7 株すべてが変異株であったのに対し, カテーテル非留置症例から分離された 46 株では 27 株 (58.7%) が変異株であり, カテーテル留置症例からの変異株分離頻度が有意に高かった ($p < 0.05$)。また, 既往のニューキノロン薬服薬の有無が明確な 31 例では, 服薬の既往のある 14 例中 11 例 (78.6%) から変異株が分離され, 服薬の既往のない 17 例中 9 例 (52.9%) より高率であったが, 有意差は認められなかった。その他の背景因子として年齢, 性別, 感染部位, 基礎疾患の種類についても検討したが, これらの背景因子には有意差は認められなかった。

3. *gyrA* 遺伝子変異と MIC との関係

ニューキノロン薬投与前に分離された 47 株と, 投薬前には *P. aeruginosa* が分離されず, 投薬後にのみ分離された 6 株を加えた合計 53 株について, *gyrA* 遺伝子変異の有無と OFLX の MIC との関係を検討した。

OFLX の MIC が 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下の 21 株では, 変異が認められたのは 1 株 (4.8%) のみであり, この株は Thr-83 コドン内に単独変異を認めたが, OFLX の MIC は 0.78 $\mu\text{g/ml}$ であった。一方 MIC が 25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の 32 株では全株に変異が認められた。また, 重複変異は MIC が 200 $\mu\text{g/ml}$ から認められ, その頻度は MIC が 400 $\mu\text{g/ml}$ になるとさらに高率になった (Table 2)。

4. *gyrA* 遺伝子変異の有無と臨床効果

OFLX, LVFX または AM を 5~7 日間投薬した後の臨床効果が明確な *P. aeruginosa* 感染例 47 例について, *gyrA* 遺伝子変異の有無と細菌学的効果との関係を検討した。

Table 3 に示したように, 変異を認めない 20 株中 18 株 (90.0%) まだが消失したが, 変異を認めた 27 株では 3 株 (11.1%) が消失したにとどまり, 変異株の消失率が有意に低かった ($p < 0.01$)。

投薬前に変異を認めなかったにもかかわらず存続した 2 例からの投薬後分離株はいずれも変異を認め, 1 株は Thr-83 コドン内の単独変異で, OFLX の MIC は投薬前の 1.56 $\mu\text{g/ml}$ から投薬後は 200 $\mu\text{g/ml}$ に上昇していた。また, 他の 1 株は Asp-87 コドン内の単独変異で, OFLX の MIC は投薬前の 3.13 $\mu\text{g/ml}$ から投薬後は 12.5 $\mu\text{g/ml}$ に上昇していた。

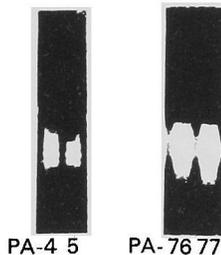
Table 2. Relation between MICs of ofloxacin and mutations in the *gyrA* gene

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	No. of strains	Strains with		
		no mutation (%)	single mutation (%)	double mutation (%)
≤ 12.5	21	20 (95.2)	1 (4.8)	0
25~100	14	0	14 (100)	0
200	13	0	11 (84.6)	2 (15.4)
400	5	0	2 (40.0)	3 (60.0)

Table 3. Eradication rates for *Pseudomonas aeruginosa* related to mutation in the *gyrA* gene

Mutation	No. of strains	Eradicated (%)	Persisted (%)
-	20	18 (90.0)	2 (10.0)*
+	27	3 (11.1)	24 (88.9)

p<0.01

*two strains that persisted after treatment had mutations in the *gyrA* gene

	PA-4	PA-5	PA-76	PA-77
OFLX MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	3.13	12.5	1.56	200

OFLX: ofloxacin

Fig. 3. AP-PCR fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa*.

PA-4 and PA-5 were judged to be identical strains, but PA-76 and PA-77 were not identical.

この2例を含め存続例26例について投薬前後分離株の同一性をAP-PCR法により検討したところ、投薬前に変異を認めず、投薬後分離株に変異を認めた2例では、Fig. 3のようにPA-4株とPA-5株は同一株であったが、PA-76株とPA-77株は同一株ではなく、MICが1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の株から200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の株へと菌交代したものと判定された。これ以外の24例では投薬前後の株はすべて同一株であった。

投薬前に変異を認めたが消失した3株中1株はThr-83コドン内の単独変異(OFLXのMIC 0.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、1株はAsp-87コドン内の単独変異(OFLXのMIC 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、他の1株は両部位の重複変異(OFLXのMIC 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)であった。また、投薬前に変異を認め存続した24株中22株はThr-83コドン内の単独変異、2株は重複変異であったが、投薬前後における変異の種類には変化を認めなかった。

III. 考 察

世界初のニューキノロン薬である norfloxacin (NFLX) が発見されたのは1980年¹⁰⁾、本邦でNFLXが市販されたのは1984年であるが、それ以前の1978年に分離された *P. aeruginosa* はOFLXに良好な感受性を示し、今回の検討ではMIC₅₀は3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、MIC₉₀は25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であったが、市販4~5年後の1988年~1989年に分離された株では、すでにMIC₅₀は12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、MIC₉₀は>100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と耐性化が進んでおり、

その後も1993年までは耐性化が著明であった。

P. aeruginosa に対するOFLXのMIC分布をみると、12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 付近にトラフが認められるため、細菌学的なMICのブレイクポイントは12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と考え、MIC 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を耐性株としてその頻度を検討したが、1978年の11.8%から1988年~1989年には48.6%と急増し、その後1993年まで徐々に増加していた。

今回検討対象とした、ニューキノロン薬の臨床効果を判定し得た47例について、OFLXのMICと細菌学的効果との関係を見ると、MICが12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の21株中19株(90.5%)が消失しているのに対し、MICが25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の26株では3株(11.5%)が消失したのみであり、この間に有意差(p<0.01)が認められることから、複雑性尿路感染症由来の *P. aeruginosa* に対するMICの臨床的ブレイクポイントは、細菌学的ブレイクポイントと同じ12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であると考えられ、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の耐性株が近年増加していることは、臨床効果に直接影響するという意味からきわめて重要であると思われる。

P. aeruginosa のニューキノロン薬耐性については、すでに1985年に ciprofloxacin (CPFX) の長期投薬例においてCPFXのMICが0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に上昇した1例が英国より報告されており¹¹⁾、その後cystic fibrosisに伴う気管支肺炎では当初考えられていたより耐性化の頻度が高いこと¹²⁾、またCPFXを用いた治療においてMICが4倍以上になった場合を耐性化と考えると、95例中25例(26.3%)に耐性化が認められ、CPFXによる治療上重要な問題であることが指摘されている¹³⁾。

その後、CPFX、OFLX、enoxacin (ENX) 耐性 *P. aeruginosa* が1983年の3%から1986年には10%に増加したとするドイツからの報告¹⁴⁾、CPFXのMICが4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を耐性とした場合、その頻度は1983年0.7%、1986年1.0%、1989年3.8%、1990年7.0%と次第に増加したというヨーロッパ12か国の成績¹⁵⁾、また、尿由来株についてはNFLXのMICが2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を耐性とした場合、耐性株の頻度は1987年35%、1988年37%、1989年38%、1990年46%と増加しているとのフランスからの報告¹⁶⁾、NFLXのMICが8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を耐性とした場合、1991年には17%、1993年には21%がNFLX耐性であったとするスウェーデンからの報告¹⁷⁾、NCCLSの基準に従った場合の耐性株の頻度はCPFX 15%、NFLX 19%、OFLX 23%であったとする北米(アメリカ、カナダ)59施設の成績¹⁸⁾などがあいつぎ、また本邦でも1986年頃よりNFLX耐性 *P. aeruginosa* が増加したとの報告がなされている¹⁹⁾。

このように報告により耐性のブレイクポイントが異なり、また地域差があるため耐性株の頻度は報告によ

り異なっているが、全体としてニューキノロン耐性の *P. aeruginosa* が増加しつつあることは世界的な傾向であると思われる。これらの報告にくらべ今回の成績は、OFLX の MIC 25 $\mu\text{g/ml}$ 以上を耐性と、耐性のブレイクポイントを諸家の報告より高い点に置いたにもかかわらず、耐性株の頻度は高率であった。この理由はかならずしも明確ではないが、わが国におけるニューキノロン薬の使用頻度が高いこと、また、今回の対象が尿由来株であったことのいずれもが関係していると思われる。

しかし、今回の検討では 1994 年～1995 年の分離株では耐性株の増加傾向は停止しており、MIC₅₀、MIC₉₀ともに低下していた。この理由も明確でないが、ニューキノロン薬の使用を 1 か月中止した後に分離された *P. aeruginosa* に対する NFLX、OFLX、ENX、CPFX などの MIC に改善傾向が認められたとの報告²⁰⁾があり、我々も最近 *P. aeruginosa* に対するニューキノロン薬の効果が低下したため、*P. aeruginosa* 感染例に対するニューキノロン薬の使用を控えていることから、使用頻度の低下がひとつの理由と考えられる。いずれにしろ今後の耐性菌の動向を注意深く観察する必要がある。

P. aeruginosa のキノロン耐性機序に関してはいくつかの機序が報告されているが、今回はキノロン耐性に関連する変異が高頻度に検出される *Escherichia coli* の *gyrA* 蛋白の Ser-83 および Asp-87 に相当する Thr-83 および Asp-87 のコドン内における *gyrA* 遺伝子変異が *P. aeruginosa* においても頻度が高いと考えられることから²¹⁾、*gyrA* 遺伝子変異について検討することとした。

今回検討した尿由来 *P. aeruginosa* における *gyrA* 遺伝子変異の頻度は、ニューキノロン投薬前の分離株では 57.4 %、投薬後分離株では 100 % と予想外に高率であり、特に投薬後分離株では投薬前分離株にくらべて有意に高率であった ($p < 0.01$)。臨床分離 *P. aeruginosa* における *gyrA* 遺伝子変異の頻度に関して、Yonezawa ら²²⁾ は 1989 年分離株では 50 株中 1 株も認められなかったが、1993 年分離株では 160 株中 15 株 (9.4 %) に認められたと報告しているが、今回の我々の検討ではさらに高率であった。Yonezawa らが検討した *P. aeruginosa* の由来が明確でないため正確な理由は不明であるが、尿由来株では一般にニューキノロン耐性株の頻度が高いことから²³⁾、*gyrA* 遺伝子変異の頻度も高かったものと思われる。

このような *gyrA* 遺伝子変異株が分離される症例の背景因子の検討では、カテーテル留置症例からの分離頻度が有意に高率であった。一般にカテーテル留置症例では抗菌薬の投与期間が長期になりがちであり、またバイオフィルムの形成など、除菌されにくい条件があることが原因と思われる。ニューキノロン服薬の既往のある症例でも変異株の分離頻度が高かったが有意差

ではなかった。これは服薬歴の明確な症例が少なかったことが原因と思われる、ニューキノロン投薬前分離株より投薬後分離株において変異株の分離頻度が有意に高率であったことから考えても、ニューキノロン薬の服用は変異出現の危険因子として重要と思われる。また、今回の検討症例のなかでわずか 1 例ではあるが、7 日間のニューキノロンによる治療中に変異が発現したことは特記すべきことと考えられる。

OFLX の MIC との関係では、MIC が 25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の株では全株に変異が認められたが、この濃度は MIC の細菌学的ブレイクポイント、また臨床的ブレイクポイントとも一致しており、このため *gyrA* 遺伝子変異株の除菌率が有意に低くなったものと考えられる。いずれにしろ *gyrA* 遺伝子に変異を有する *P. aeruginosa* に対して、現存のニューキノロン薬は効果を期待できないと考えざるを得ない。ニューキノロン耐性菌は同系統の薬剤間で交叉耐性を示すばかりでなく、その耐性機序が膜透過性の低下または efflux の亢進である場合には、一部の β -ラクタム薬やアミノ配糖体薬など、構造的に関連のない薬剤にも耐性となる可能性があり²⁴⁻²⁶⁾、*gyrA* 遺伝子変異のために耐性となった *P. aeruginosa* を、さらにニューキノロン薬に暴露することにより膜変化が加わり、ニューキノロン高度耐性となるとともに、他系統の薬剤にも耐性となる可能性を考えれば、*gyrA* 遺伝子変異を伴う *P. aeruginosa* 感染症をニューキノロン薬で治療することはむしろ禁忌であり、避けねばならないと思われる。

文 献

- 1) Kureishi A, Diver J M, Beckthold B, et al.: Cloning and nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* DNA gyrase *gyrA* gene from PAO1 and quinolone-resistant clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1944~1952, 1994
- 2) Chamberland S, Bayer A S, Schollaardt T, et al.: Characterization of mechanisms of quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in vitro and in vivo during experimental endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 624~634, 1989
- 3) Nikaido H: Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 264: 382~388, 1994
- 4) Inoue Y, Sato K, Fujii T, et al.: Some properties of subunits of DNA gyrase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and its nalidixic acid-resistant mutant. *J. Bacteriol.* 169: 2322~2325, 1987
- 5) Yoshida T, Muratani T, Iyobe S, et al.: Mechanism of high resistance to quinolones in urinary tract isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1466~1469, 1994
- 6) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について. *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 7) Deguchi T, Yasuda M, Nakano M, et al.: Rapid screening of point mutations of the *Neisseria gonorrhoeae* *gyrA* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1466~1469, 1994

- rhoeae gyrA* gene associated with decreased susceptibilities to quinolones. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2255~2258, 1996
- 8) UTI研究会 (代表 大越正秋): UTI 薬効評価基準 (第3版) *Chemotherapy* 34: 408~441, 1986
 - 9) Kersulyte D, Struelens M J, Deplano A, et al.: Comparison of arbitrarily primed PCR and macrorestriction (pulsed-field electrophoresis) typing of *Pseudomonas aeruginosa* strain from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2216~2219, 1995
 - 10) Ito A, Hirai K, Inoue M, et al.: In vitro antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17: 103~108, 1980
 - 11) Crook S M, Selkon J B, McLardy Smith P D: Clinical resistance to long-term oral ciprofloxacin. *Lancet* i: 1275, 1985
 - 12) Roberts C M, Batten J, Hodson M E: Ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas*. *Lancet* i: 1442, 1985
 - 13) Scully B E, Neu H C, Parry M F, et al.: Oral ciprofloxacin therapy of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* i: 819, 1986
 - 14) Kresken M Wiedemann: Development of resistance to nalidixic acid and the fluoroquinolones after the introduction of norfloxacin and ofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1285~1288, 1988
 - 15) Kresken M, Hafner D, Mittermayer H, et al.: Prevalence of fluoroquinolone resistance in Europe. *Infection* 22: S90~S98, 1994
 - 16) Aubert G, Levy P P, Ros A, et al.: Changes in the sensitivity of urinary pathogens to quinolones between 1987 and 1990 in France. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11: 475~477, 1992
 - 17) Rydberg J, Larsson C, Miorner H: Resistance to fluoroquinolone in *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Scand. J. Infect. Dis.* 26: 317~320, 1994
 - 18) Jones R N, Hoban D J, the North American Ofloxacin Study Group: North American (United States and Canada) comparative susceptibility of two fluoroquinolones: Ofloxacin and ciprofloxacin. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 18: 49~56, 1994
 - 19) 加藤広行, 都築 博, 伊豫部志津子, 他: 臨床由来緑膿菌のニューキノロン剤耐性変異について. *Chemotherapy* 38: 1003~1011, 1990
 - 20) 永武 毅, 渡辺貴和雄, 力富直人, 他: 尿路由来院内感染症の起炎菌に対するニューキノロン剤使用 1 か月間中止後の MIC 変化. *Chemotherapy* 39: 459~466, 1991
 - 21) Yoshida H, Nakamura M, Bogaki M, et al.: Proportion of DNA gyrase mutants among quinolone-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1273~1275, 1990
 - 22) Yonezawa M, Takahata M, Matsubara N, et al.: DNA gyrase mutation in quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1970~1972, 1995
 - 23) Shalit I, Haas H, Berger S A: Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to fluoroquinolones following four years of use in a tertiary care hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 30: 149~152, 1992
 - 24) Scanders C C, Sanders W E Jr, Goering R V, et al.: Selection of multiple antibiotic resistance by quinolones, β -lactams, and amino-glycosides with special reference to cross-resistance between unrelated drug classes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26: 797~801, 1984
 - 25) Masuda N, Sakagawa E, Ohya S: Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 645~649, 1995
 - 26) Zhanel G G, Karlowsky J A, Saunders M H, et al.: Development of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* after serial exposure to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 489~495, 1995

Clinical significance of DNA gyrase *gyrA* mutations in quinolone-resistant urinary isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Yukimichi Kawada, Takashi Deguchi, Masahiro Nakano and Mitsuru Yasuda

Department of Urology, Gifu University School of Medicine, 40 Tsukasa-machi, Gifu-shi 500 Japan

The clinical significance of DNA gyrase *gyrA* mutations in quinolone-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with complicated urinary tract infection (UTI) was studied by investigating annual changes in ofloxacin (OFLX) resistance, incidence of DNA gyrase *gyrA* mutations, and the relation between *gyrA* mutation and bacteriological response to the fluoroquinolone treatment. OFLX-resistant ($\text{MIC} \geq 25 \mu\text{g/ml}$) strains increased from 11.8% in 1978 to 58.6% in 1993. DNA gyrase *gyrA* mutation was observed in 27 (57.4%) of 47 strains isolated before fluoroquinolone treatment and in 100% of 30 strains isolated after treatment. Mutation was observed in 1 (4.8%) of the 21 strains for which the MIC of OFLX was $12.5 \mu\text{g/ml}$ or lower and in 100% of the 32 strains for which the MIC of OFLX was $25 \mu\text{g/ml}$ or higher. The eradication rate for the 20 strains without mutations was 90.0%, versus 11.1% for the 27 strains with mutations. This difference was statistically significant ($p < 0.01$). The bacteriological and clinical breakpoint of OFLX MIC was considered to be $12.5 \mu\text{g/ml}$, and this was also the concentration at which *gyrA* mutations began to appear. DNA gyrase *gyrA* mutation was considered to be clinically important as a mechanism of the fluoroquinolone resistance of urinary isolates of *P. aeruginosa*.