

## 【原著・基礎】

NalB 型排出蛋白質をもつ緑膿菌に対する FOM と  $\beta$ -ラクタム薬の併用効果川畑 敏枝<sup>1)</sup>・蔵園 瑞代<sup>1)</sup>・新井田昌志<sup>1)</sup>・吉田 隆<sup>1)</sup>・後藤 直正<sup>2)</sup>・西野 武志<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 明治製菓株式会社薬品総合研究所\*<sup>2)</sup> 京都薬科大学微生物学教室

(平成 9 年 9 月 29 日受付・平成 9 年 11 月 10 日受理)

緑膿菌 PAO 1 株を親株として、ofloxacin (OFLX) と cefsulodin (CFS) を混合した薬剤平板で選択することにより、OprM を過剰産生した NalB 型多剤耐性株の R 1 株を分離した。R 1 株の最小発育阻止濃度 (MIC) は、ceftazidime (CAZ), sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ), chloramphenicol (CP), OFLX および tetracycline (TC) 親株である PAO 1 株のそれらに比し 4~8 倍上昇した。しかし、fosfomycin (FOM), imipenem (IPM), gentamicin (GM) に対する MIC は変わらなかった。R 1 株から外膜蛋白質を分離し、OprM モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット法により OprM 蛋白質の増加を確認した。この OprM 蛋白質を保持する R 1 株に対し、FOM に SBT/CPZ あるいは CAZ を同時併用すると強い殺菌作用が認められた。しかし、TC および CP との併用効果は認められなかった。排出蛋白質の良好な基質である TC, CP において併用効果はみられなかったが、 $\beta$ -ラクタム系薬剤である CAZ と SBT/CPZ に対して顕著な併用効果がみられた。また、FOM 処理菌では CPZ の菌体内取り込み量が増加していた。以上のことから、FOM が NalB 型の排出蛋白質を持つ株に対しても  $\beta$ -ラクタム系薬剤との併用効果を示すことが認められた。

**Key words:** 緑膿菌, 排出蛋白質, FOM,  $\beta$ -ラクタム, 併用

緑膿菌は多くの抗菌薬に対して自然耐性を示し、臨床の場において問題となっている。この耐性の要因として、本質的な膜透過性の悪さと修飾酵素による抗菌薬の不活化があげられる。しかし、近年、緑膿菌の耐性機構の 1 つとして薬剤を排出 (efflux) することによる耐性をもつことが明らかになった<sup>1)</sup>。この耐性機構は、MexA-MexB-OprM<sup>2,3)</sup> (NalB 型) と名付けられた 3 つの膜蛋白質が連携することにより、菌体内の薬剤を菌体外へ排出することによるものである<sup>4-6)</sup>。NalB 型の排出蛋白質は、CP, TC, キノロン系の薬剤をはじめ、 $\beta$ -ラクタム系の薬剤をも排出することで知られている。NalB 型耐性緑膿菌に対して FOM を CAZ あるいは SBT/CPZ との併用作用を検討し、有効である成績を得たので報告する。

## I. 材料および方法

## 1. 使用薬剤

PAO 1 の多剤耐性株の作製には、ofloxacin (OFLX; 第一製薬), cefsulodin (CFS; 武田薬品) を用いた。また、薬剤感受性の測定は、OFLX, CFS, fosfomycin (FOM; 明治製菓), ceftazidime (CAZ; グラクソ), imipenem/cilastatin (IPM/CS; 萬有製薬), chloramphenicol (CP; 三共), tetracycline (TC; 明治製菓), aztreonam (エーザイ), gentamicin (GM; 明治製菓) を用いた。

## 2. 使用菌株

被験菌は *P. aeruginosa* PAO 1 株とその薬剤耐性株である R 1 を用いた。またカルバペネームを産生する plasmid pMS 363 は、群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設より分与を受け、*P. aeruginosa* R 1 株に形質転換した株を使用した。

## 3. 薬剤感受性測定 (MIC 測定)

日本化学療法学会感受性測定法<sup>7)</sup> に準じて、寒天平板希釈法による MIC の測定を行った。

## 4. ウェスタンブロット法

マウス抗 OprM モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット法<sup>8)</sup> により、OprM 蛋白質を確認した。

## 5. 殺菌作用

Mueller Hinton broth (MHB; Difco) で一夜培養した被験菌を分光光度計を用い、260 nm の波長で O.D. = 0.25 に調整し、同培地で 1,000 倍に希釈し、37 °C で 2 時間振盪培養後、PAO 1 株, R 1 株の FOM 1/4 MIC 濃度 (25  $\mu$ g/ml) と TC を PAO 1 株の 1/8 MIC 濃度または 1/16 MIC 濃度 (TC 6.25, 3.13  $\mu$ g/ml), R 1 株の 1/4 MIC 濃度または 1/8 MIC 濃度 (TC 25, 12.5  $\mu$ g/ml) を組み合わせ、同様に CP を PAO 1 株の 1/4 MIC 濃度または 1/8 MIC 濃度または 1/16 MIC 濃度 (25, 12.5, 6.25  $\mu$ g/ml), R 1 株の 1/16 MIC 濃度

または 1/4 MIC 濃度または 1/8 MIC 濃度 (800, 400, 100  $\mu\text{g/ml}$ ), CAZ を PAO 1 株の 1/2 MIC 濃度または 1/4 MIC 濃度 (0.78, 0.39  $\mu\text{g/ml}$ ), R 1 株の 1/2 MIC 濃度または 1/4 MIC 濃度 (3.13, 1.56  $\mu\text{g/ml}$ ), CAZ を PAO 1 株の 1/2 MIC 濃度または 1/4 MIC 濃度 (3.13, 1.56  $\mu\text{g/ml}$ ), R 1 株の 1/2 MIC 濃度または 1/4 MIC 濃度 (25, 12.5  $\mu\text{g/ml}$ ) を組み合わせて同時に添加, さらに振盪培養を行い, 経時的に生菌数を測定した。

#### 6. 外膜蛋白質の確認および FOM 作用時の外膜蛋白質の変化

L-broth で一夜培養した被験菌を同培地で 10 倍に希釈し, 37  $^{\circ}\text{C}$  で振盪培養を行った。また, FOM を作用させたものは, 培養 2 時間後, FOM を各々の濃度となるように添加し, 4 時間培養を行った。一方, FOM 50  $\mu\text{g/ml}$  濃度存在下で一定時間ずつ作用させ, 培養を行った。4  $^{\circ}\text{C}$ , 7,000 rpm 30 分で集菌し, 50 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl] ethanesulfonic Acid (HEPES) 緩衝液で洗浄後, 菌体を超音波破碎し, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 7,000 rpm 30 分で遠心した上清を 4  $^{\circ}\text{C}$ , 40,000 rpm 60 分で遠心分離した。遠心後の沈渣を膜画分とした。この膜画分に最終濃度が 1% となるように, HEPES 緩衝液で溶解した N-lauroylsarcosine (SIGMA) を添加し, 30  $^{\circ}\text{C}$ , 30 分静置し, 内膜画分の可溶化を行った。4  $^{\circ}\text{C}$ , 40,000 rpm 30 分で遠心分離し, 沈渣を HEPES 緩衝液で洗浄し, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 40,000 rpm 30 分で遠心分離した。沈渣を 1/15 M Phosphate buffer (pH 7.0) に懸濁し, 外膜蛋白質のサンプルとした。また, Lowry 法<sup>9)</sup> を用い, 外膜蛋白質のサンプルの蛋白量を調整した後, Laemmli 法<sup>10)</sup> を用い, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った。

#### 7. 薬剤の菌体内濃度の測定

$\beta$ -ラクタマーゼ活性を利用して<sup>11)</sup>, FOM 処理後の緑膿菌 R 1 株の CPZ の菌体内濃度の検討を行った。緑膿菌 R 1 株へ緑膿菌由来のカルバペネマーゼ産生 pMS 363 プラスミド<sup>12)</sup> を形質転換した。この R 1/pMS 363 株を 5 mM  $\text{MgCl}_2$  を含む L-broth で 35  $^{\circ}\text{C}$ , 18 時間培養した菌液 1.7 ml を同培地 50 ml に添加し, 3 時間振盪培養後, FOM を最終濃度 50  $\mu\text{g/ml}$  となるよう添加し, 2, 4 時間後に菌体を 25  $^{\circ}\text{C}$ , 3,000 rpm, 15 分間遠心後, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  を含む 10mM phosphate buffer (P.B., pH 7.2) 20 ml にて洗浄した。遠心後の菌体を P.B. に懸濁し, 分光光度計にて波長 660 nm で吸光度 7.0 に調整した。調整した生菌の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性は, 30  $^{\circ}\text{C}$  の温度条件下にて, 100 mM NaCl と 5 mM  $\text{MgCl}_2$  を含む 50 mM の P.B. (pH 7.2) 2.4 ml に調製した生菌 0.3 ml と基質として 0.3 ml の 250  $\mu\text{M}$  の CPZ (Co) を添加し, CPZ の吸光度と CPZ 加水分解時の吸光度との差が最大の時の波長 273 nm における

吸光度の減少速度を測定した。生菌の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性から, 調製した生菌の遠心上清中の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性を差し引いた  $\beta$ -ラクタマーゼ活性 ( $V_i$ ) と菌体内の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性 ( $V_o$ ), CPZ のミカエリス定数 ( $k_m$ )<sup>13)</sup> から, 菌体内に取り込まれた CPZ の濃度 ( $C_i$ ) を以下の式から求めた。

$$C_i = \{V_i/V_o\} \{k_m \cdot C_o / (k_m + C_o - (V_i/V_o) \cdot C_o)\}$$

## II. 実験結果

### 1. 感受性測定 (MIC 測定)

PAO 1 とその多剤耐性株である R 1 の MIC を測定した結果, 親株である PAO 1 と比較して R 1 では, FOM, IPM/CS, GM を除いた薬剤に対して, 2~16 倍以上の MIC の上昇がみられた (Table 1)。しかし, FOM, IPM/CS, GM の 3 剤においては, PAO 1 と R 1 では, MIC 値に変化は認められなかった。

### 2. 外膜蛋白質の確認

SDS-PAGE を用いて PAO 1 と R 1 の外膜蛋白質を比較した (Fig. 1)。親株である PAO 1 と比較して R 1

Table 1.

	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	<i>P. aeruginosa</i> PAO 1	<i>P. aeruginosa</i> R 1
Fosfomycin	100	100
Imipenem	1.56	1.56
Ceftazidime	1.56	6.25
Sulbactam/Cefoperazone	6.25	50
Cefsulodin	3.13	6.25
Aztreonam	3.13	25
Chloramphenicol	100	800
Ofloxacin	1.56	6.25
Gentamicin	3.13	3.13
Tetracycline	25	100

Agar dilution method

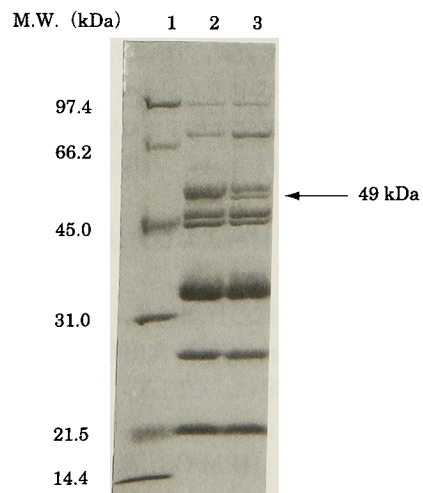


Fig. 1. Profile of the outer membrane protein determined by SDS-PAGE. lane 1, marker; lane 2, *P. aeruginosa* PAO 1; lane 3, *P. aeruginosa* R 1

では、50 kDa 付近の蛋白質の増量が認められた。

### 3. ウェスタンブロット法

R 1 株の 50 kDa 付近の外膜蛋白質がすでに報告されている NalB 型の OprM 蛋白質であることを確認するために、マウス抗 OprM モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット法を用いた結果、R 1 株は NalB 型の OprM 排出蛋白質を持つ株であることが確認された (Fig. 2)。

### 4. 殺菌作用

NalB 型の排出蛋白質は、CP, TC, キノロン系、 $\beta$ -

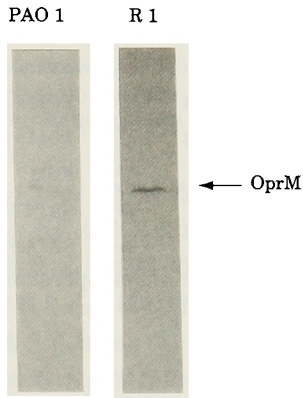


Fig. 2. Immunoblotting of outer membrane protein probed with MAb to OprM. lane PAO 1, *P. aeruginosa* PAO 1; lane R 1, *P. aeruginosa* R 1

ラクタム系の薬剤を排出することで知られるが<sup>34-6)</sup>, CP, TC, CAZ, SBT/CPZ を用い、FOM を同時併用することにより、併用効果が見られるかどうか殺菌作用の面で検討した (Fig. 3 a)。FOM と CP, TC を同時併用したとき、TC では R 1 株においては若干の併用効果がみられるものの、PAO 1 株においては併用効果がみられなかった。しかし、FOM と CAZ, SBT/CPZ を併用した場合、PAO 1 株、R 1 株共に顕著な併用効果がみられた (Fig. 3 b)。

### 5. FOM 作用時の外膜蛋白質の変化

FOM 作用時の外膜蛋白質の変化をみた (Fig. 4)。FOM の各濃度を作用させた場合では、外膜蛋白質 OprM には変化がみられなかったが、濃度依存的に OprG, 高分子量の膜画分の減少がみられた (Fig. 4 a)。また、FOM 50  $\mu$ g/ml 濃度を 1, 2, 3, 4 時間作用させた場合は外膜蛋白質に変化がみられなかった (Fig. 4 b)。

### 6. 薬剤の菌体内濃度の検討

カルバペネマーゼ活性を利用した R 1/pMS 363 株の菌体内への CPZ の取り込み量を測定した結果、FOM 4 時間処理後、FOM 未処理菌と比較して菌体内の CPZ の取り込み量の増加が認められた (Fig. 5)。

## III. 考 察

緑膿菌をキノロン系薬剤と  $\beta$ -ラクタム系薬剤とで選択することで多剤耐性の緑膿菌が選択されることは、以前から報告されており<sup>14)</sup>, また、そのような株が NalB 変異株と類似の耐性を示すことが知られている。

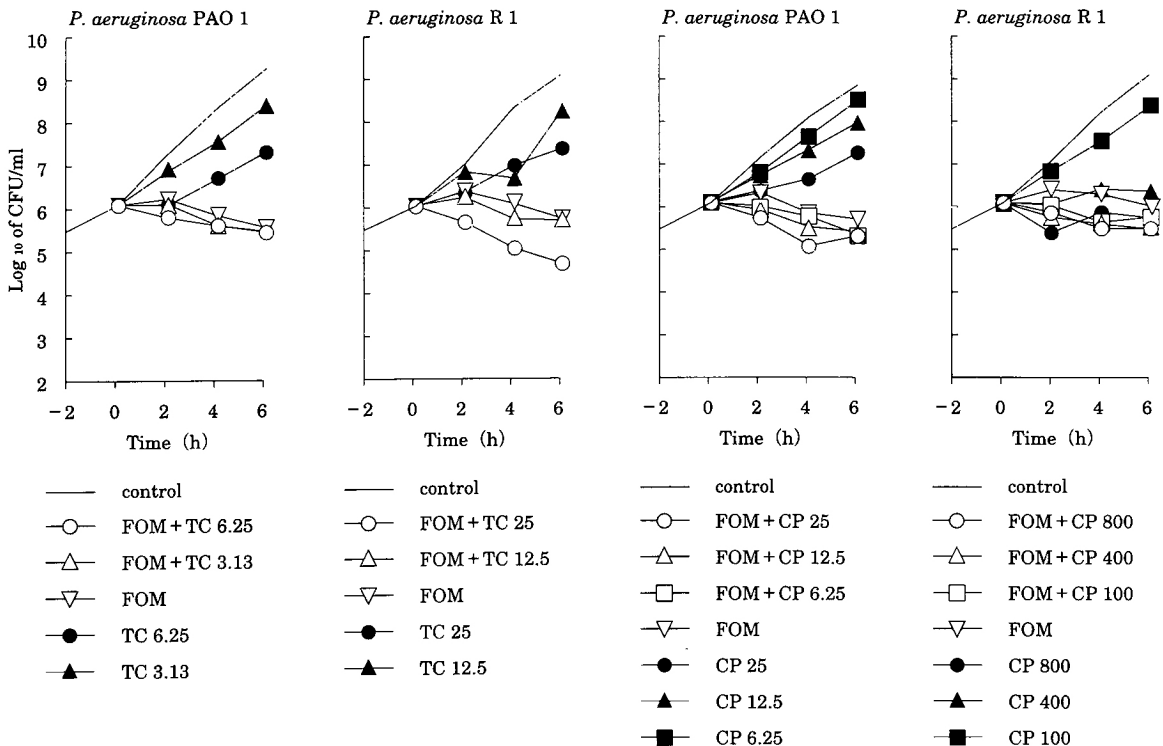


Fig. 3 a. Combination effects of fosfomycin (FOM) and tetracycline or chloramphenicol against *Pseudomonas aeruginosa* (concentration of FOM: 25  $\mu$ g/ml).

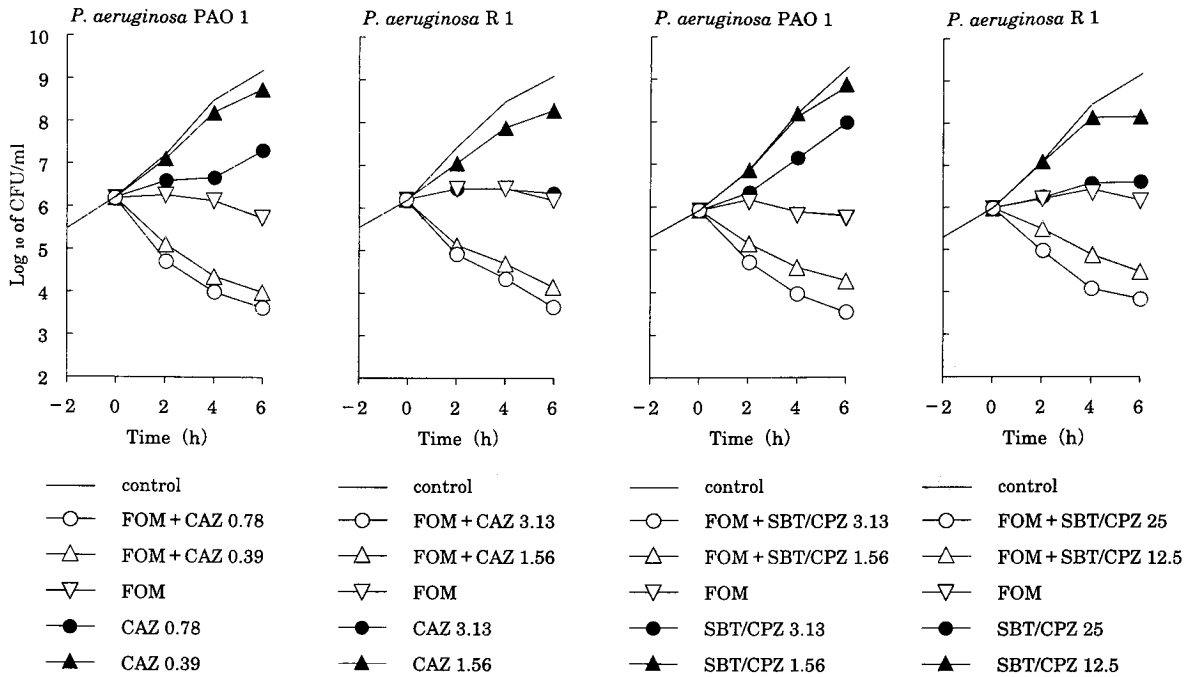
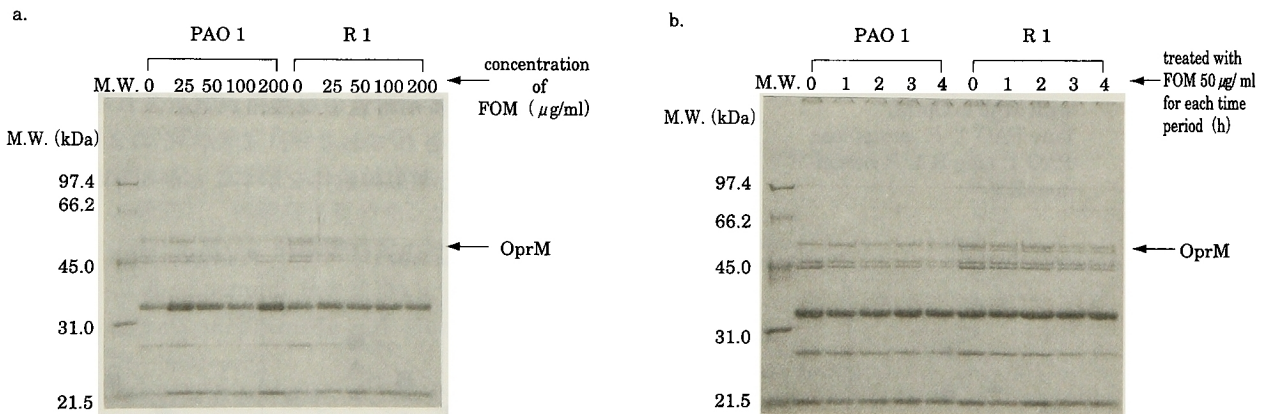


Fig. 3 b. Combination effects of fosfomycin (FOM) and ceftazidime or sulbactam/cefoperazone against *Pseudomonas aeruginosa* (concentration of FOM: 25  $\mu$ g/ml).



FOM: fosfomycin

Fig. 4. Profiles of the outer membrane protein by SDS-PAGE.

a. *P. aeruginosa* PAO 1 (lane 2 ~ 6), *P. aeruginosa* R 1 (lane 7 ~ 11) no drug (lane 2, 7), FOM 25  $\mu$ g/ml (lane 3, 8), FOM 50  $\mu$ g/ml (lane 4, 9), FOM 100  $\mu$ g/ml (lane 5, 10), FOM 200  $\mu$ g/ml (lane 6, 11), M. W. (lane 1).

b. *P. aeruginosa* PAO 1 (lane 2~6), *P. aeruginosa* R 1 (lane 7~11), no drug (lane 2, 7), treated with FOM 50  $\mu$ g/ml for 1 hour (lane 3, 8), 2 hours (lane 4, 9), 3 hours (5, 10), 4 hours (lane 6, 11).

最近では、それらの変異株は、MexA-MexB-OprM 蛋白質による排出の亢進によるものであることが明らかとなっている<sup>4,5)</sup>。この蛋白質は、緑膿菌が元来兼ね備えている耐性機構である。NalB 型の耐性を示す R 1 株と PAO 1 株とでは、FOM に対する薬剤感受性に変化が見られず、FOM は MexA-MexB-OprM 蛋白質による薬剤排出の基質になりえないことが推察された。

FOM の作用機作は、細胞壁のペプチドグリカン合成の初期段階の合成を阻害することによる。一方、 $\beta$ -ラクタム剤はペプチドグリカン生合成の最終段階である架橋反応を阻害する。このように作用点が違うことか

ら、 $\beta$ -ラクタム剤とは交差耐性を示さない。このような作用点の違いも FOM と  $\beta$ -ラクタム剤との優れた併用効果の一因と考えられる。

今回の実験では、FOM と TC, CP の併用効果を検討した結果、R 1 株では併用効果が認められなかったことから、FOM は MexA-MexB-OprM 排出蛋白質には影響しないことが推測された。また、SDS-PAGE での FOM 作用時の OprM 蛋白質に変化は見られず、OprM 蛋白質に直接関与していないことが推察された。しかし、FOM の作用濃度依存的に OprG 蛋白質の減少がみられ、外膜蛋白質に何らかの影響を与えている可能性

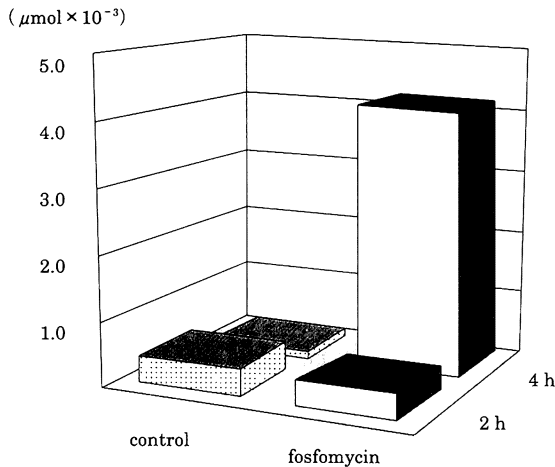


Fig. 5. Concentrations of substrate of cefoperazone in the periplasmic space in fosfomycin-treated *Pseudomonas aeruginosa* R 1/pMS 363.

も考えられる。また、FOM 処理した時の CPZ の菌体内取り込み量が上昇したことから、FOM と  $\beta$ -ラクタム剤との併用効果は、FOM の作用により菌体内への  $\beta$ -ラクタム剤の取り込み量の増加によるものであることも一因として考えられる。

以上の結果から NalB 型の排出蛋白質をもつ多剤耐性緑膿菌に対しても FOM と  $\beta$ -ラクタム剤を併用することにより、優れた併用効果が得られることが確認された。

#### 謝 辞:

本研究の抗菌薬の透過性の解析のために、カルバペネマーゼを産生する pMS 363 プラスミドを分与して下さいました群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設伊豫部志津子助教授に深謝致します。また本論文は、第 44 回日本化学療法学会総会にて発表し、座長である癌研究会附属病院内科林 泉先生より投稿のご推薦をいただきましたことを深謝いたします。

#### 文 献

- 1) Stuart B Levy: Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agent Chemother.* 36: 695~703, 1992
- 2) Li X, Nikaido H, Poole K: Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aerugi-*

*nosa*. *Antimicrob. Agent Chemother.* 39: 1948~1953, 1995

- 3) Gotoh N, Tsujimoto H, et al.: The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is Encoded by oprK of the mexA-mexB-oprK multidrug resistance operon. *Antimicrob. Agent Chemother.* 39: 2567~2569, 1995
- 4) Nikaido H: Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science* 264, 15 Apr.: 382~388, 1994
- 5) Li X, Ma D, Livermore M D, et al.: Role of efflux pump (s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: Active efflux as a contributing factor of  $\beta$ -lactam resistance. *Antimicrob. Agent Chemother.* 38: 1742~1752, 1994
- 6) 柴谷雄一, 山口明人: 細菌の薬剤排出蛋白。日本細菌学雑誌 50 (2): 403~421, 1995
- 7) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改定について。 *Chemotherapy* 29: 76~79, 1981
- 8) Gotoh N, Itoh N, et al.: Isolation of OprM-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* by transposon insertion mutagenesis: Evidence of involvement in multiple antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 122: 267~274, 1994
- 9) Lowry O H, Rosenbrough N J, Farr A L, Randall R J: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol. Chem* 193: 265~275, 1951
- 10) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680~685, 1970
- 11) Zimmermann W, Rosselet A: Function of the outer membrane of *Escherichia coli* as a permeability barrier to beta-lactam antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* 64: 337~340, 1991
- 12) Iyobe Y, Tsunoda M, Mutsuhashi S: Cloning and expression in Enterobacteriaceae of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* plasmid. *FEMS Microbiol. Lett.* 121: 175~180, 1994
- 13) Watanabe M, Iyoben S, et al.: Transferable Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agent Chemother.* 35: 147~151, 1991
- 14) Masuda N, Ohya S: Cross-resistant to Meropenem, Cephems, and Quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agent Chemother.* 36: 1847~1851, 1992

Synergistic effects of fosfomycin (FOM) in combination with  $\beta$ -lactam antibiotics on NalB type *Pseudomonas aeruginosa* with efflux proteins

Toshie Kawabata<sup>1)</sup>, Mizuyo Kurasono<sup>1)</sup>, Masashi Niida<sup>1)</sup>, Takashi Yoshida<sup>1)</sup>,  
Naomasa Gotoh<sup>2)</sup> and Takeshi Nishino<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Meiji Seika Kaisha, Ltd. Pharmaceutical Research Center, 760 Morooka-cho, Kohoku-ku, Yokohama 222, Japan

<sup>2)</sup>Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University, Yamashina, Kyoto 607, Japan

We obtained *Pseudomonas aeruginosa* strain R 1 from *P. aeruginosa* PAO 1 grown on an agar plate containing ofloxacin (OFLX) and cefsulodin (CFS). The sensitivity *P. aeruginosa* R 1 was altered to become more resistant to chloramphenicol (CP), tetracycline (TC), quinolones and  $\beta$ -lactam antibiotics than *P. aeruginosa* PAO 1, the parent strain. We studied bactericidal activities when TC, CP, ceftadidime (CAZ), sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ) were combined with fosfomycin (FOM). The combination of FOM with CAZ, SBT/CPZ or  $\beta$ -lactam antibiotics, had a synergistic effect, but TC and CP which are also pumped-out by efflux proteins were not affected. More CPZ accumulated in the periplasm of *P. aeruginosa* R 1 treated with FOM than in the untreated bacteria. It was concluded that FOM synergistically potentiated the bactericidal activity of  $\beta$ -lactam antibiotics against NalB type *P. aeruginosa* with the efflux proteins.