

Oral streptococci のニューキノロン薬耐性化に関する検討

金子 明寛¹⁾・佐々木次郎¹⁾・島津 光伸²⁾・金山 明子³⁾・雑賀 威³⁾・小林 寅吉³⁾

¹⁾ 東海大学医学部口腔外科学教室*

²⁾ 三菱化学ビーシーエル 細胞遺伝解析部

³⁾ 同 化学療法研究室

(平成 10 年 5 月 19 日受付・平成 10 年 6 月 18 日受理)

歯科口腔外科領域感染症患者から分離した *Streptococcus sanguis* および *Streptococcus anginosus* のニューキノロン薬耐性化について *gyrA* 変異を中心に検討した。ニューキノロン薬である ofloxacin (OFLX) に感受性の *S. sanguis* QS-951 および *S. anginosus* QS-701 に OFLX および DU-6859a を *in vitro* で連続的に接触させ、それぞれのニューキノロン薬耐性株を得た。この実験で DU-6859a は OFLX と比較してより強い誘導効果をもつことが判明した。すなわち、DU-6859a 誘導株は OFLX 誘導株に比べ各種ニューキノロン薬に対する耐性度が高く、DU-6859a の MIC は 25 µg/ml 以上と OFLX 誘導株より 4~8 倍高い値を示した。これら誘導耐性株の *gyrA* 異変について解析した結果、DU-6859a によって得られた高度耐性株は codon 83 のアミノ酸の serine から phenylalanine への変異に加えて codon 87 のアミノ酸が glutamic acid から lysine へと変異し、両菌種とも共通のアミノ酸の変化が認められた。これらのことから oral streptococci のニューキノロン薬耐性化は、これらの薬剤による耐性誘導によるもので、ニューキノロン薬の種類によっては *gyrA* の変異が異なりその耐性度も相違することが認められた。

Key words: oral streptococci, 耐性誘導, fluoroquinolone resistant, *gyrA* mutation

歯科口腔外科領域にニューキノロン薬が使用されたのは 1988 年の ofloxacin (OFLX) が最初である。その後 10 年が経過し、今日では適応抗菌薬として 6 種類のニューキノロン薬がこの領域の感染症の治療に使用されている。本来ニューキノロン薬は菌性感染症の主な起炎菌である oral streptococci¹⁾ に対してペニシリン系抗菌薬ほど強い抗菌活性を有していなかったため²⁾、当初ニューキノロン薬の使用頻度はさほど高くなかった。最近ではペニシリンアレルギーや本菌のペニシリン系抗菌薬に対する感受性の低下³⁾ によって、ペニシリン系抗菌薬に代わりニューキノロン薬が広く使用されるようになった。特に近年開発されたニューキノロン薬の一部は、抗菌スペクトラムがグラム陽性菌へ拡大され、ペニシリン系抗菌薬よりも強い活性を有するものがある⁴⁾。しかし、この系統の薬剤の使用頻度の上昇とともにニューキノロン薬耐性化も問題視されている⁵⁾。

今回われわれは歯科口腔外科領域の主要分離菌である oral streptococci 2 菌種のニューキノロン薬耐性化について、実験的に誘導して得られた耐性株の耐性機構を *gyrA* 変異を中心に検討した。

I. 材料と方法

1. 試験菌株

1995 年に当大学病院にて菌性感染症患者より分離し、10% スキムミルクで凍結保存された OFLX 感受性 *Streptococcus sanguis* QS-951, *Streptococcus anginosus* QS-701 および同薬耐性の *S. sanguis* QS-95101 を使用した。また、対照株として *S. sanguis* ATCC 10556 と *S. anginosus* ATCC 33397 を用いた。なお試験菌株の同定は api 20 STREP (bio-Mérieux) を用いて行った。

2. 使用抗菌薬

Ofloxacin (OFLX; 第一製薬), ciprofloxacin (CPFX; バイエル薬品), norfloxacin (NFLX; 杏林製薬), DU-6859a (第一製薬), ampicillin (ABPC; SIGMA), 以下力価の明らかな 5 薬剤を用いた。

3. MIC 測定法

MIC 測定は日本化学療法学会標準法⁶⁾ に従い、寒天平板希釈法で行った。すなわち 10⁶CFU/ml に調製した被検菌液を、各抗菌薬の 2 倍希釈系列濃度を含む 5% ウマ脱繊維血液加 Mueller Hinton medium (DIFCO) にマイクロプランター (佐久間製作所) を用いて接種し、35℃ で 18 時間培養した後、菌の発育が認められなかった最小濃度を MIC とした。

4. 耐性誘導

臨床材料より分離した OFLX 感受性の *S. sanguis* QS-951 および *S. anginosus* QS-701 を 5%ウマ脱繊維血液加 Blood agar base No. 2 (OXOID, 以下血液寒天培地) に接種し, 35 °C で 48 時間培養した。発育した試験菌を綿棒でかきとり, 1/2 MIC の OFLX または DU-6859a を含む上記の血液寒天培地に塗抹し, 35 °C で 48 時間培養した。同じ濃度の薬剤含有培地に 3 回継代培養した後, 発育した菌をかきとり 1 MIC, 2 MIC, 4 MIC の順に同様の操作を繰り返し, 最高 256 MIC まで耐性誘導を行った。

5. *gyrA* 遺伝子の解析

各試験菌からの DNA 抽出は, 常法⁷⁾ に従いフェノール/クロロホルム処理した後, エタノール沈殿することにより行った。GenBank Accession No. X 06744 をもとに設計した primer; forward: 5'-TGGGTGTGACACC(AGCT)GA(GT)AA(AG)-3', reverse: 5'-ATACGTGCTTC(AG)GTATA(AC)CG-3' を用いて, 次の反応液組成と反応条件でニューキノロン薬耐性に関与することが知られている領域を含む DNA (*Escherichia coli* KL-16 の sequence 614~380; codon 55~127 に相当) を PCR 法により増幅した。

1.0 μ l Template DNA, 1.0 μ l each dNTP (10 mM), 5.0 μ l 10 \times Taq DNA polymerase buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.1% gelatin), 2.0 μ l each primer (25 pmol/ μ l), 0.25 μ l Taq DNA polymerase (5 U/ μ l), 40 cycles

(52 °C 1 min, 72 °C 1 min, 93 °C 0.5 min)。

得られた PCR 産物を塩基配列の決定は Model 373 A オートシーケンサー (ABI 社) を用いて行った。

II. 結 果

1. 薬剤感受性

Table 1 に示した通り, 臨床分離の OFLX 耐性株 *S. sanguis* QS-95101 に対する OFLX, CPMX, NFLX の MIC は 25, 50, 100 μ g/ml と検討に用いた 3 種のニューキノロン薬に対して交差耐性を示した。しかし, DU-6859a の MIC は 0.39 μ g/ml と ABPC と同等の低い値を示した。一方, OFLX 感受性 *S. sanguis* QS-951 に対する OFLX, CPMX, NFLX の MIC はそれぞれ 1.56, 1.56, 12.5 μ g/ml と ATCC 10556 とほぼ同等の値であったが, DU-6859a の MIC は 0.10 μ g/ml と他のニューキノロン薬より優れた活性を示し, また, ABPC よりも低い値であった。

ニューキノロン薬感受性の QS-951 を OFLX で誘導し, 耐性株 QS-951 OFm を得た。この菌株は用いたすべてのニューキノロン薬に耐性化し, DU-6859a の MIC は 12.5 μ g/ml, 他 3 薬剤の MIC はすべて 100 μ g/ml であった。DU-6859a によって誘導して得られた QS-951 DUm は, DU-6859a の MIC が 50 μ g/ml, 他 3 薬剤が 100 μ g/ml 以上と QS-951 OFm 以上にすべてのニューキノロン薬に耐性化した。なお, 誘導の前後で ABPC の MIC に変化はみられなかった。

Table 2 に示す通り, OFLX 感受性 *S. anginosus* QS-701 は ATCC 33397 と比較して各ニューキノロン薬に

Table 1. Drug susceptibilities of ofloxacin or DU-6859a induced resistant mutants of *Streptococcus sanguis*

Strain	MIC (μ g/ml)				
	DU-6859a	ofloxacin	ciprofloxacin	norfloxacin	ampicillin
QR-95101	0.39	25	50	100	0.39
QS-951	0.10	1.56	1.56	12.5	0.20
QS-951 OFm	12.5	100	100	100	0.20
QS-951 DUm	50	>100	>100	>100	0.20
ATCC 10556	0.20	3.13	3.13	12.5	0.20

QR-95101: wild type (fluoroquinolone resistant)

QS-951 OFm: ofloxacin induced resistant strain of QS-951

QS-951 DUm: DU-6859a induced resistant strain of QS-951

Table 2. Drug susceptibilities of ofloxacin or DU-6859a induced resistant mutants of *Streptococcus anginosus*

Strain	MIC (μ g/ml)				
	DU-6859a	ofloxacin	ciprofloxacin	norfloxacin	ampicillin
QS-701	0.05	0.78	0.78	3.13	0.10
QS-701 OFm	3.13	100	25	50	0.10
QS-701 DUm	25	100	25	100	0.10
ATCC 33397	0.20	3.13	3.13	12.5	0.05

QS-701 OFm: ofloxacin induced resistant strain of QS-701

QS-701 DUm: DU-6859a induced resistant strain of QS-701

約 4 倍感受性で, DU-6859a, OFLX, CPFX および NFLX の MIC はそれぞれ 0.05, 0.78, 0.78 および 3.13 $\mu\text{g/ml}$ であった。この株の OFLX 誘導株 QS-701 OFm に対する DU-6859a を除く 3 薬剤の MIC は 25 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ と高い値であったが, DU-6859a の MIC は 3.13 $\mu\text{g/ml}$ にとどまった。DU-6859a 誘導株 QS-701 DUm は OFLX, CPFX, NFLX に対して QS-701 OFm とほぼ同等に耐性化し, また, DU-6859a の MIC も 25 $\mu\text{g/ml}$ と元株の QS-701 にくらべ約 500 倍上昇した。なお, 両誘導株とも ABPC の MIC は 0.10 $\mu\text{g/ml}$ で, *S. sanguis* 同様元株と同じ値であった。

2. *gyrA* 変異

Table 3 にニューキノロン薬感受性の *S. sanguis* QS-951 および *S. anginosus* QS-701 の OFLX および DU-6859a による耐性誘導後の *gyrA* の変異について示した。QS-951, QS-701 の codon 83 および 87 のアミノ酸は ATCC 株のそれと同様, それぞれ serine (TCT または TCC) および glutamic acid (GAA) であった。臨床分離ニューキノロン薬耐性 *S. sanguis* QR-95101 では codon 83 のアミノ酸が phenylalanine (TTC) と *gyrA* の変異が認められた。一方, *S. sanguis* の OFLX 誘導株 QS-951 OFm は codon 83 のアミノ酸が serine (TCT) から tyrosine (TAT) に変化し, codon 87 のアミノ酸には変化はみられなかった。DU-6859a 誘導株 QS-951 DUm では codon 83 のアミノ酸の phenylalanine (TTT) への変異に加え, codon 87 の glutamic acid (GAA) が lysine (AAA) へと変化し, 二重の変異が認められた。

S. anginosus においては OFLX 誘導株 QS-701

Table 3. *gyrA* mutation of ofloxacin or DU-6859a induced strains of *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus anginosus*

Strain	Mutation in <i>gyrA</i>	
	codon 83	codon 87
<i>S. sanguis</i>		
QS-951	TCT (Ser)	GAA (Glu)
QS-951 OFm	TAT (Tyr)	GAA (Glu)
QS-951 DUm	TTT (Phe)	AAA (Lys)
QR-95101	TTC (Phe)	GAA (Glu)
ATCC 10556	TCT (Ser)	GAA (Glu)
<i>S. anginosus</i>		
QS-701	TCC (Ser)	GAA (Glu)
QS-701 OFm	TTC (Phe)	CAA (Gln)
QS-701 DUm	TTC (Phe)	AAA (Lys)
ATCC 33397	TCC (Ser)	GAA (Glu)

QR-95101: wild type (fluoroquinolone resistant)

QS-951 OFm: ofloxacin induced resistant strain of QS-951

QS-951 DUm: DU-6859a induced resistant strain of QS-951

QS-701 OFm: ofloxacin induced resistant strain of QS-701

QS-701 DUm: DU-6859a induced resistant strain of QS-701

Ser: serine, Tyr: tyrosine, Phe: phenylalanine, Glu: glutamic acid,

Lys: lysine, Gln: glutamine

OFm および DU-6859a 誘導株 QS-701 DUm の codon 83 のアミノ酸はともに serine (TCC) から phenylalanine (TTC) に, codon 87 は前者が glutamic acid (GAA) から glutamine (CAA) に, 後者は lysine (AAA) へと二重変異が認められた。

III. 考 察

ニューキノロン薬はグラム陽性菌からグラム陰性菌まで広い抗菌スペクトラムを有することからわが国の臨床の現場で広く応用されている^{8,9)}。歯科口腔外科領域で用いられている経口抗菌薬のなかでも近年ニューキノロン薬が占める割合は比較的高く, 従来より用いられてきたペニシリン系抗菌薬に急迫する。特に近年開発された比較的新しいキノロン薬は, 本領域の感染症患者からもっとも多く分離される oral streptococci に対し ABPC 以上の抗菌活性を有するものもある⁹⁾。また, *Streptococcus mitis* や *Streptococcus oralis* などにみられる ABPC 感受性の経年的な低下³⁾ や耐性株の出現¹⁰⁾ およびペニシリンアレルギーの問題などから臨床におけるニューキノロン薬の有用性が評価されている。

しかし, 他の領域の感染症よりの分離菌を含め, ニューキノロン薬耐性菌の出現については多くの報告がある^{11,12)}。ニューキノロン薬耐性に関する機構としては本薬のターゲットである DNA gyrase をコードする *gyrA* 遺伝子の変異¹³⁾ が主で, グラム陰性菌における取込み能の低下¹⁴⁾ や排出ポンプ efflux の作用^{15,16)}, また近年では topoisomerase IV 遺伝子 (*parC*) の変異¹⁷⁾ が耐性化に関与するとの報告もある。われわれの成績では, 1995 年に臨床分離された *S. sanguis* や *S. mitis* に明らかなニューキノロン薬耐性株の出現を確認している。

一般にニューキノロン薬耐性株は *in vitro* における同薬との接触によって容易に生じることが知られている¹⁸⁾。このような事実をもとにわれわれは, oral streptococci の主要 2 菌種 *S. sanguis* および *S. anginosus* のニューキノロン薬感受性株を用い *in vitro* で耐性誘導を行い, そのおもな耐性機構である *gyrA* の変異を中心に検討を行った。その結果, 両菌種ともに sub-MIC の OFLX および DU-6859a との連続的な接触によって, ニューキノロン薬の MIC は顕著に上昇することが確認された。さらに, OFLX との接触により得られた耐性誘導株と DU-6859a によって得られた株では両薬剤の MIC が異なることを認めた。このことから, 誘導に用いたニューキノロン薬はそれぞれ *gyrA* の異なった領域に耐性変異を誘発した可能性が示唆された。これらの誘導耐性株の *gyrA* の変異を調べた結果, *S. sanguis*, *S. anginosus* とともに DU-6859a によって得られた誘導耐性株は codon 83 のアミノ酸が serine から phenylalanine に, codon 87 が glutamic acid から lysine に共通の変異がみられた。すなわち, codon 83 のアミノ酸変異に加え codon 87 のアミノ酸変異は, これらの菌

株の DU-6859a に対する耐性化に重要な役割を果たしていると思われた。

これらの現象に関連して Janoir ら¹⁹⁾ は, *Streptococcus pneumoniae* でニューキノロン薬の高度耐性化に *gyrA* に加え *parC* の変異が必要であると示している。また, これらの高度耐性株の *gyrA* 遺伝子における codon 88 が, glutamic acid (GAA) から lysine (AAA) に特異的に変異していること¹⁹⁾ は興味深い事実である。他方, 今回 *gyrB* について検討は行っていないが, Tankovic ら¹⁷⁾ の成績から *S. pneumoniae* や他の streptococci のニューキノロン薬耐性化に *gyrB* はあまり関与していないと思われる。すなわち, 種差はあるものの *Streptococcus* のニューキノロン薬高度耐性には *gyrA* の codon 83 より下流域の変異が強く関与していることが示唆される。これらの事実より, *Streptococcus* は臨床において高頻度に使われたニューキノロン薬によって同薬に耐性化し, 使用した薬剤の種類によっては変異部位が異なる特有の耐性株を生じると考えられる。実際に今回用いた *S. sanguis* のニューキノロン薬耐性臨床分離株は OFLX, CPF, NFLX に対し耐性 (MIC: 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上) を示すものの, DU-6859a に対しては ATCC 10556 と同様感受性 (MIC: 0.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で, *gyrA* の変異は codon 83 の phenylalanine (TTC) のみであった。この菌株は 1995 年に分離された株で, 従来使用されたニューキノロン薬によって耐性化した株であると推測される。結果には示さなかったが, われわれが過去に実施してきた oral streptococci のニューキノロン薬感受性成績では *S. anginosus* を含む *Streptococcus milleri* group にニューキノロン薬耐性株を認めていない^{1,20)}。しかし, 今回の実験から *S. anginosus* もニューキノロン薬によって容易に耐性化することが確認された。现阶段ではこの両事実に対し明確な説明はできないが, 本菌種の病巣での存在部位やニューキノロン薬に対する反応, または殺菌性などが他の oral streptococci とは異なるのかもしれない。これらの事実は今後 oral streptococci のニューキノロン薬耐性を予測するうえで重要な問題であると考えられる。

本論文は第 44 回日本化学療法学会東日本支部総会において発表し, 座長より学会誌に投稿するよう推薦を受けたものである。

文 献

- 1) Kaneko A, Sasaki J: MICs of 407 oral streptococci strains isolated from closed abscess of odontogenic infection. *Chemotherapy* 41: 1049~1055, 1993
- 2) Chin N X, Neu H C: Ciprofloxacin, a quinolone carboxylic acid compound active against aerobic and anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25: 319~326, 1984
- 3) Bantar C, Canigia L F, Rellosio S, et al.: Species belonging to the "*Streptococcus milleri*" group: Antimicrobial susceptibility and comparative prevalence in significant clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2020~2022, 1996
- 4) Piddock L J V: Minireview: New quinolones and gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 163~169, 1994
- 5) Tankovic J, Desplaces N, Duval J, et al.: Notes: In vivo selection during pefloxacin therapy of a mutant of *Staphylococcus aureus* with two mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1149~1151, 1994
- 6) 日本化学療法学会 MIC 測定法改訂委員会: 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) Marmur J: A procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208~218, 1961
- 8) 真崎宏則, 松本慶蔵, 渡辺貴和雄, 他: Levofloxacin の *in vitro* 抗菌力, 喀痰中移行率, および呼吸器感染症における臨床的有用性に関する研究。 *Chemotherapy* 40: 336~347, 1992
- 9) 斎藤 功, 吉田雅彦, 黄瀬友信, 他: 女子急性単純性膀胱炎の治療後長期観察: UTI 薬効評価基準と IDSA 基準との比較。 *日化療会誌* 44: 896~902, 1996
- 10) Doern G V, Ferraro M J, Brueggemann A B, et al.: Emergence of high rates of antimicrobial resistance among viridans group Streptococci in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 891~894, 1996
- 11) Shalit I, Berger S A, Gorea A, et al.: Widespread quinolone resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a general hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 593~594, 1989
- 12) Tanaka M, Kumazawa J, Matsumoto T, et al.: High prevalence of *Neisseria gonorrhoeae* strains with reduced susceptibility to fluoroquinolones in Japan. *Genitourin Med.* 70: 90~93, 1994
- 13) 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
- 14) Fukuda H, Hosaka M, Hirai K, et al.: New norfloxacin resistance gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1757~1761, 1990
- 15) Zeller V, Janori C, Kitzis M D, et al.: Active efflux as a mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1973~1978, 1997
- 16) Neyfakh A A, Borsch C M, Kaatz G W: Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 128~129, 1993
- 17) Tankovic J, Perichon B, Duval J, et al.:

- Contribution of mutations in *gyrA* and *parC* genes to fluoroquinolone resistance of mutants of *Streptococcus pneumoniae* obtained in vivo and in vitro. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2505~2510, 1996
- 18) Kojima T, Inoue M, Mitsuhashi S: In vitro activity of AT-4140 against quinolone- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. agents Chemother. 34: 1123~1127, 1990
- 19) Janoir C, Zeller V, Kitzis M D, et al. : High-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2760~2764, 1996
- 20) 佐々木次郎, 唐木田一成, 山根伸夫, 他: 新規経口用キノロン薬 balofloxacin の口腔細菌に対する抗菌力と唾液・抜歯創内移行について。日治療会誌 43: 490~494, 1995

Mechanism of resistance to fluoroquinolone in oral streptococci

Akihiro Kaneko¹⁾, Jiro Sasaki¹⁾, Mitsunobu Shimazu²⁾, Akiko Kanayama³⁾,
Takeshi Saika³⁾ and Intetsu Kobayashi³⁾

¹⁾ Department of Oral Surgery, School of Medicine Tokai University, Bouseidai, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan

²⁾ Department of Genetics, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories Inc.

³⁾ Chemotherapy Division, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories Inc.

Mechanisms of resistance to fluoroquinolones in oral streptococci such as *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus anginosus* were studied. *S. sanguis* QS-951 and *S. anginosus* QS-701, susceptible to ofloxacin, were serially transferred on agar, with each sample containing gradually increased concentrations of ofloxacin or DU-6859a. Although the resistances of these strains to fluoroquinolones were markedly induced with both drugs, MIC values of DU-6859a-induced resistant strains of *S. sanguis* QS-951 and *S. anginosus* QS-701 were 4-8 fold higher than those of ofloxacin-induced strains. The *gyrA* was analyzed to elucidate the mechanisms of resistance to fluoroquinolones in these strains. The mutation of serine at codon 83 to phenylalanine or tyrosine was found in each of the resistant strains and occurred by inductions with either ofloxacin or DU-6859a, and the additional mutation of glutamic acid at codon 87 to lysine was found in high-level resistant strains by induction with DU-6859a. Marked differences in types of *gyrA* mutation and in levels of resistance were found in the *in vitro* resistant strains of oral streptococci, when different kinds of fluoroquinolones were used as the inducers.