

力価 1,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$, SIGMA), tetracycline (TC, 46 H 1470, 力価 985 $\mu\text{g}/\text{mg}$, SIGMA), chloramphenicol (CP, 73 H 0174, 力価 1,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$, SIGMA), gentamicin (GM, GMMC-4-3, 力価 623 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 明治製薬) を使用した。これらすべての抗菌薬の水溶液は用時調製した。

2. 被験菌株

被験菌は *P. aeruginosa* PAO 1 および同菌株 9.65 \times 10⁷CFU を NFLX 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有する L-broth 寒天平板培地に塗抹し、35 $^{\circ}\text{C}$ 一夜培養後、発育したコロニーより分離した多剤耐性株である R 2 と、*nfxB* 型排出システムを持つ KG 3000⁸⁾を用いた。また、 β -ラクタムの菌体内蓄積量の測定には、カルバペネマーゼを産生する plasmid pMS 363⁹⁾を、*P. aeruginosa* R 2 に導入した形質転換株を使用した。

3. 抗菌薬に対する感受性測定

日本化学療法学会の最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 測定法¹⁰⁾に準じ、Mueller Hinton agar (MHA, BBL) を用いた寒天平板希釈法により測定した。なお、前培養には Mueller Hinton broth (MHB, BBL) を使用した。

4. 外膜蛋白質 OprJ の検出

既報⁸⁾のようにマウス抗 OprJ モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法により OprJ 蛋白質を検出した。

5. 併用殺菌作用の検討

被験菌の短時間殺菌作用を検討することにより FOM と他の抗菌薬との併用作用を検討した。すなわち、*P. aeruginosa* PAO 1 および R 2 を被験菌とし、それぞれを MHB で 37 $^{\circ}\text{C}$ 一夜培養した。この培養液を同新鮮培地に接種し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間振盪培養後、FOM (1/4, 1/8 MIC) と他の抗菌薬 (1/4 MIC) を単独または同時併用添加した。さらに振盪培養を続け、経時的にサンプリングを行い、抗菌薬無添加の MHA 平板に塗抹した。塗抹した MHA 平板を一夜培養後、発育したコロニー数を計測して生菌数を求めた。

6. *P. aeruginosa* の外膜蛋白質 OprJ におよぼす FOM の作用

被験菌を L-broth で一夜培養し、5% 接種菌量になるように新しい L-broth に接種し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間振盪培養を行った。この培養液を用いて、FOM の外膜蛋白質 OprJ への影響を調べるために、100, 50, 25 および 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度となるように FOM を添加し、それぞれ 1~4 時間培養した。それぞれの培養液は 4 $^{\circ}\text{C}$ 、6,000 $\times\text{g}$ で 30 分間遠心し集菌した。菌体は 30 mM Tris-HCl (pH 8.0) を添加し洗浄した。洗浄した菌体と同じ緩衝液に懸濁した後、菌体を超音波破碎した。その後、4 $^{\circ}\text{C}$ 、6,000 $\times\text{g}$ で 30 分間遠心し、未破碎の菌体をパックした。この上清をさらに 4 $^{\circ}\text{C}$ 、100,000 $\times\text{g}$ で 60 分間遠心すること

により得られた沈渣を全膜画分とした。この全膜画分に終濃度が 1% となるように N-lauroylsarcosine (SIGMA) を添加し、30 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間静置し、内膜を可溶化した。その後、この溶液を 4 $^{\circ}\text{C}$ 、18,000 $\times\text{g}$ で 40 分間遠心し沈渣を得た。得た沈渣を 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0) に懸濁し、外膜蛋白質を得た。

なお、蛋白質量は Lowry 法¹¹⁾により測定した。得た蛋白質は Laemmli¹²⁾の方法に準じた sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 電気泳動法により解析した。

7. CFPM の菌体内濃度測定

Zimmermann と Rosselet の方法¹³⁾に準じて FOM 処理後の R 2 への CFPM の取り込みを検討した。このために R 2 は、カルバペネマーゼ産生 pMS 363 で形質転換した。

得られた R 2/pMS 363 を 1 μM ZnCl₂ を含む L-broth で 35 $^{\circ}\text{C}$ 、18 時間培養した菌液 1.7 ml を、新鮮な同培地 50 ml に添加し、3 時間振盪培養した。その後 FOM の最終濃度が 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加し、それぞれ 2 時間あるいは 4 時間培養を継続した。終了後、菌体を 25 $^{\circ}\text{C}$ 、3,000 rpm、15 分間遠心し菌体を得た。この菌体を 1 μM ZnCl₂ を含む 20 ml の 10 mM morpholinepropanesulfonate buffer (pH 7.0) で洗浄した。洗浄後の菌体と同じ緩衝液で懸濁後、A₆₆₀7.0 に調整した。調製した菌液 0.3 ml を 100 mM NaCl と 5 mM MgCl₂ を含む 50 mM の MOPS Buffer 2.7 ml に添加し、均一に懸濁した。基質として 0.3 ml の 125 μM の CFPM (Co) を添加して、波長 286 nm における吸光度の減少を、30 $^{\circ}\text{C}$ に保温したセル中で測定した。菌体懸濁液の β -ラクタマーゼ活性から、同じ懸濁液遠心上清中の β -ラクタマーゼ活性を差し引いた活性 (Vi) と、菌体を破碎することにより得られた全 β -ラクタマーゼ活性 (Vo) を求め、菌体内に取り込まれた CFPM の濃度 (Ci) を以下の式から計算した。なお、使用したカルバペネマーゼに対する CFPM の Km 値は、渡辺らの方法¹⁴⁾に準じて酵素を精製し、Lineweaver-Burk の式¹⁵⁾より算出した。

$$Ci = \{Vi/Vo\} \{Km \cdot Co / (Km + Co - (Vi/Vo) \cdot Co)\}$$

II. 試験結果

1. 抗菌薬に対する感受性測定

PAO 1 とその変異株である R 2 に対する MIC 値を Table 1 に示した。R 2 に対する CFPM, CZOP, CPR, NFLX, TC の MIC 値は PAO 1 に対するそれらに比べて 2~32 倍上昇した。また、R 2 に対する GM, CBPC の MIC 値は PAO 1 のそれらに比べて減少した。しかし、FOM, CAZ の両菌株に対する MIC 値は変わらなかった。

2. 外膜蛋白質プロフィールと OprJ の検出

PAO 1 と R 2 の外膜蛋白質の SDS-PAGE 像を比較すると、ほとんどの蛋白質の量的変化は見られなかったが、R 2 では *nfxB* 型排出システムを持つ KG 3000 と

同様に 54 kDa 付近に蛋白質の新生が観察された (Fig. 1)。

この蛋白質は、マウス抗 OprJ モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法により、*nfxB* 変異により過剰生産される多剤排出システム MexC-MexD-OprJ の外膜コンポーネント OprJ であることが同定された (Fig. 2)。

Table 1. Susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 and R 2 to various antibacterial agents

	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>P. aeruginosa</i> PAO 1	<i>P. aeruginosa</i> R 2
FOM	100	100
CFPM	1.56	12.5
CZOP	0.78	12.5
CPR	3.13	25
CAZ	1.56	1.56
CP	100	>100
TC	25	100
CBPC	50	12.5
NFLX	0.78	25
OFLX	0.78	25
GM	3.13	1.56

Agar dilution method

FOM: fosfomicin, CFPM: cefepime, CZOP: ceftazidime, CPR: cefpirome CAZ: ceftazidime, CP: chloramphenicol, TC: tetracycline, CBPC: carbenicillin, NFLX: norfloxacin, OFLX: ofloxacin, GM: gentamicin

3. 併用殺菌作用

被験菌に対し FOM (1/4, 1/8 MIC) と他の抗菌薬 (1/4 MIC) を単独および同時併用での殺菌作用の成績を示した (Figs. 3~5)。PAO 1 および R 2 に対し、それぞれの薬剤単独の殺菌作用に比べ、同時併用では若干の差はあるものの、いずれの組み合わせにおいても経時的な殺菌増強効果が認められた。また、薬剤排出蛋白質を持つ R 2 と持たない PAO 1 間での殺菌増強効果に大きな差は認められなかった。

4. FOM 作用時の外膜蛋白質の変化

FOM 作用後の *P. aeruginosa* R 2 株の外膜蛋白質の SDS-PAGE の電気泳動パターンを示した (Fig. 6)。100, 50, 25 および 12.5 $\mu\text{g/ml}$ の FOM を 4 時間作用させた場合でも、外膜蛋白質 OprJ の量的変化は認められなかった。さらに、50 $\mu\text{g/ml}$ の FOM を 1, 2, 3 および 4 時間作用した場合の被験菌の外膜蛋白質プロファイルを観察したところ、FOM の作用時間による外膜蛋白質 OprJ の量的な影響は、認められなかった (Fig. 7)。

5. CFPM の菌体内濃度の検討

P. aeruginosa R 2 株にカルバペネマーゼを産生する plasmid を導入した被験菌を用い、FOM の処理菌と未処理菌での CFPM の菌体内取り込み量を測定した。FOM の 2 時間処理では両者の CFPM の取り込み量に差は認められなかったが、4 時間処理により、CFPM の菌体内取り込み量が約 8 倍増加した (Fig. 8)。

III. 考 察

FOM が *nalB* 型排出蛋白質をもつ *P. aeruginosa* に対

M.W.(kDa)

marker PAO1 KG3000 R2

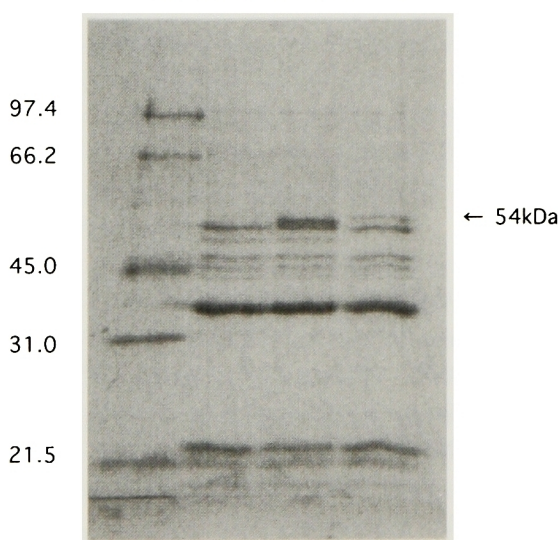


Fig. 1. Profile of the outer membrane proteins by SDS-PAGE. lane 1: marker, lane 2: *P. aeruginosa* PAO 1, lane 3: *P. aeruginosa* KG 3000, lane 4: *P. aeruginosa* R 2

KG3000 PAO1 R2

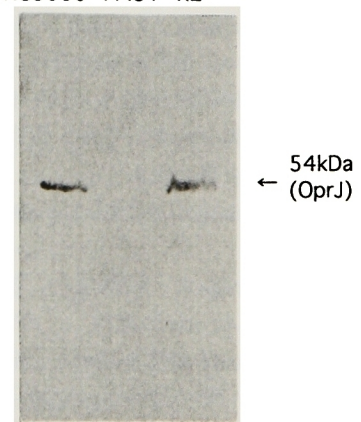


Fig. 2. Immunoblotting of outer membrane proteins probed with MAb to OprJ. lane 1: *P. aeruginosa* KG 3000, lane 2: *P. aeruginosa* PAO 1, lane 3: *P. aeruginosa* R 2

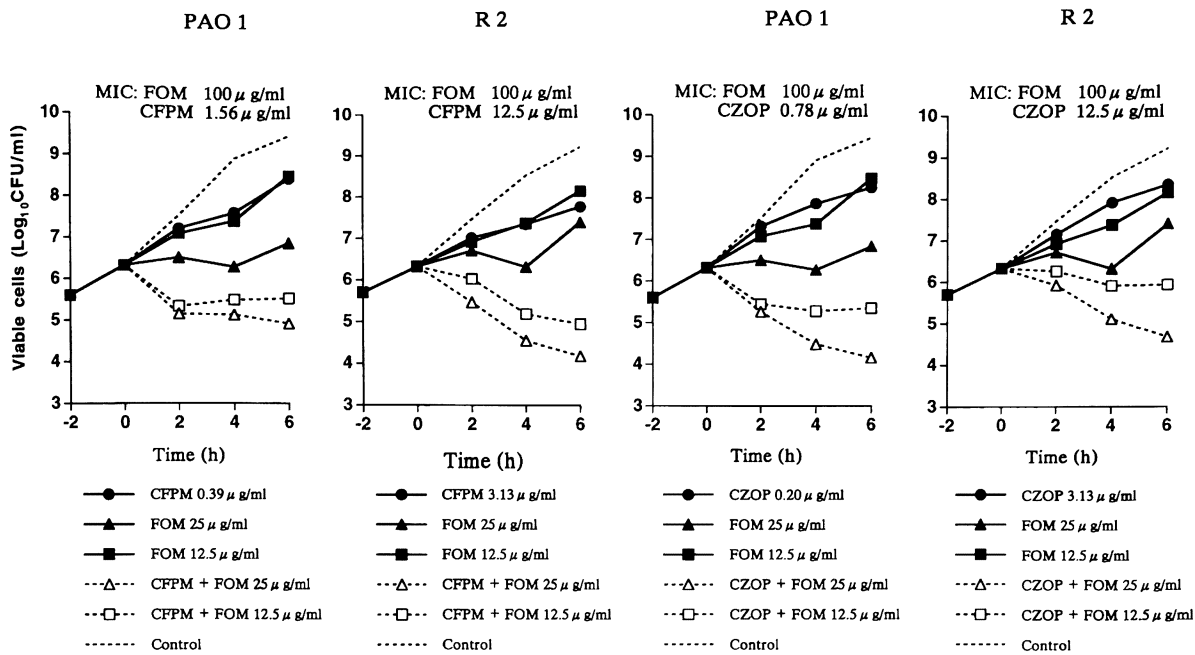


Fig. 3. Combination effects of fosfomycin (FOM) and cefepime (CFPM) or ceftazopran (CZOP) against *Pseudomonas aeruginosa* (concentration of FOM: 25 and 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

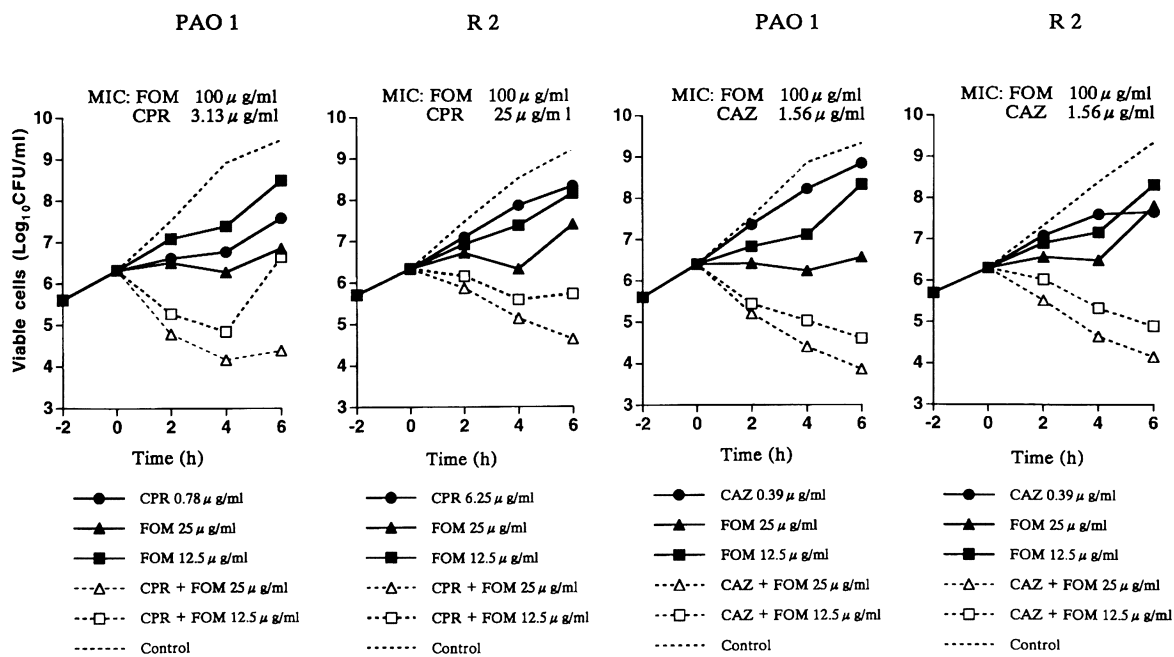


Fig. 4. Combination effects of fosfomycin (FOM) and ceftiprome (CPR) or ceftazidime (CAZ) against *Pseudomonas aeruginosa* (concentration of FOM: 25 and 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

して、 β -ラクタム系薬との併用効果を示したとの報告¹⁶⁾がある。今回われわれは、*nfxB* 型排出蛋白を持つ *P. aeruginosa* に対して FOM と β -ラクタムおよびキノロン薬の併用効果について検討した。

被験菌の抗菌薬に対する感受性測定結果から、FOM

は MexC-MexD-OprJ システムの過剰生産によって、その活性に影響を受けないことが分かった。MexC-MexD-OprJ システムの過剰生産によっても、その活性に影響を受けない FOM と、逆に、この FOM と、MexC-MexD-OprJ システムの過剰生産により活性が減弱する CFPM, CZOP, CPR, CAZ および NFLX との Sub MIC 濃度における併用殺菌作用では、それぞれの薬剤単独の殺菌作用に比べ、いずれの組み合わせでも殺菌増強効果が認められたが、薬剤排出蛋白質を持つ R2 と持たない PAO 1 間での殺菌増強効果に大きな差は認められなかった。この FOM と併用薬の両菌株に対する殺菌増強効果は FOM の MexC-MexD-OprJ システムへのなんらかの作用ではないかと考え、SDS-PAGE での FOM 作用時の OprJ 蛋白質への影響と、FOM を処理した菌の CFPM 菌体内取り込み量を測定した。その結果、SDS-PAGE での FOM 作用時の OprJ 蛋白質に変化が認められなかった。また、FOM を処理した菌の CFPM 菌体内取り込み量が処理しない菌に比べ約 8 倍に増加していたことから、FOM は排出蛋白質 OprJ には直接影響しないことが推察され、FOM と CFPM の併用による殺菌増強効果は、何らかの機構により CFPM の取り込み量が増加した結果、FOM と CFPM の併用効果が現れたものと考えられた。

多くのグラム陰性菌の外膜には疎水性経路が存在しないと言われている¹⁷⁾。また、菅野¹⁸⁾らは *P. aeruginosa* 菌体表層におよぼす FOM の影響について検討し、FOM を 1 時間以上作用させると菌体表層が疎水性に傾くと

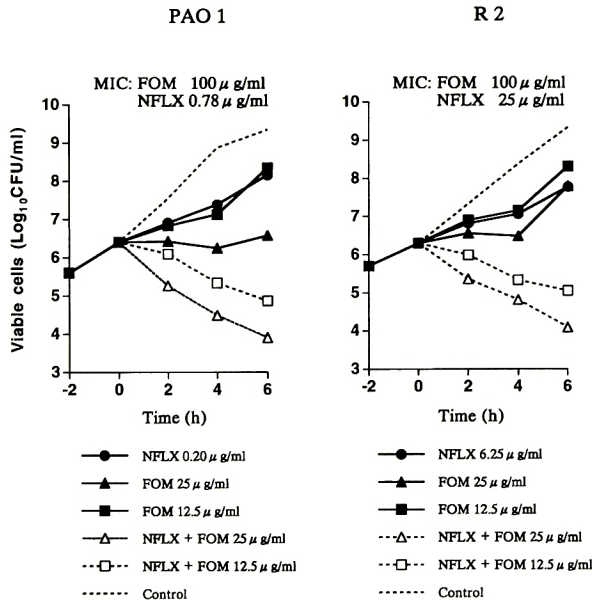


Fig. 5. Combination effects of fosfomycin (FOM) and norfloxacin (NFLX) against *Pseudomonas aeruginosa* (concentration of FOM: 25 and 12.5 $\mu\text{g/ml}$).

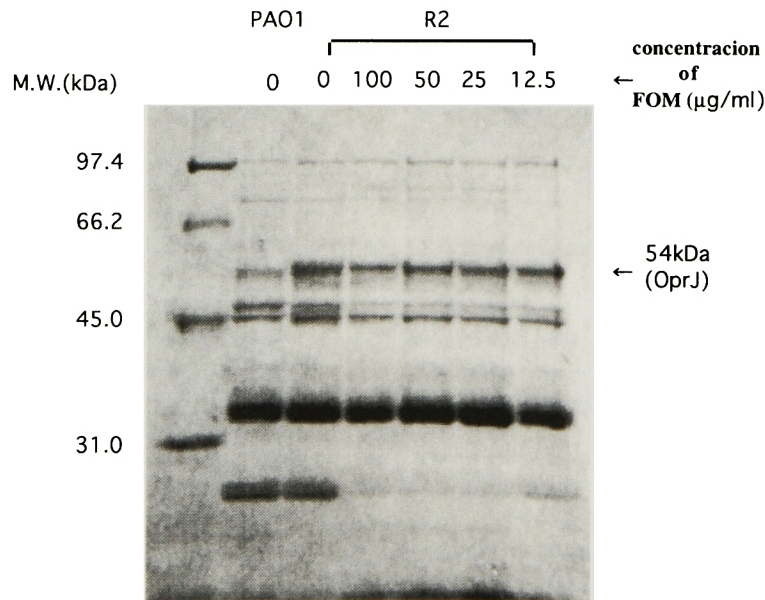


Fig. 6. SDS-PAGE Profile of outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* treated with various concentrations of fosfomycin (FOM).

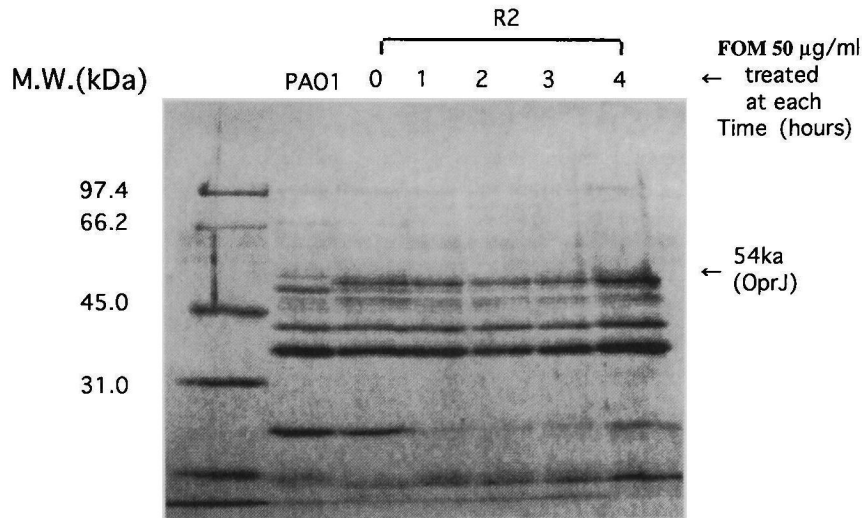


Fig. 7. SDS-PAGE Profile of outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* treated with 50 µg/ml of fosfomycin (FOM) for various times.

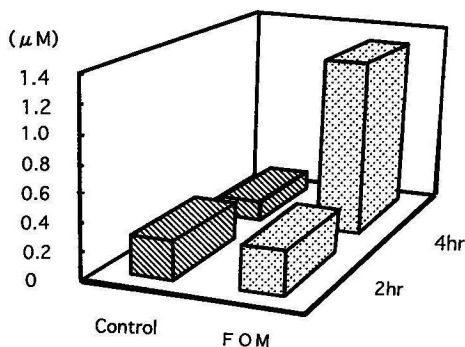


Fig. 8. Concentration of cefepime (CFPM) in the periplasmic space in *Pseudomonas aeruginosa* R2/pMS 363. treated with fosfomycin (FOM).

報告している。一方、福島、二木ら¹⁹⁾は、FOMとキノロン薬との併用において、FOMが菌体表層や外膜蛋白質になんらかの影響を与え、併用によりキノロン薬の菌体内取り込み量が増加すると報告している。また、キノロンの取り込みは Mg^{2+} で阻害され、脱共役剤などでプロトン駆動力を解消すると取り込み量が増加すること²⁰⁾が言われている。

FOMは強い陽イオンである燐をもっているため、燐イオンが外膜の電位のバランス崩し、 Mg^{2+} に影響を与えていることが考えられる。今回の検討結果から、薬剤排出蛋白質を持つR2と持たないPAO1に対する、FOMと β -ラクタム系薬およびキノロン系薬の併用による殺菌増強効果は、なんらかの作用機構により、 β -ラクタム薬やキノロン薬の菌体内への取り込み量が高め

$$C_i = (V_i/V_o) \{ K_m \cdot C_o / [K_m + C_o - (V_i/V_o) \cdot C_o] \}$$

C_i : β -Lactam concentration in the periplasm.

C_o : β -Lactam concentration in the medium.

V_i : Velocity of β -lactam diffusion across the outer membrane that corresponds to the enzyme activity in whole cells.

V_o : The β -lactamase activity in cell-free extracts.

K_m : The Michaelis constants.

られた結果、両菌株に対する併用効果が現れたものと推察される。

謝辞

今回の実験に際し、pMS 363 plasmidを分与して頂いた群馬大学医学部薬剤耐性実験施設伊豫部志津子助教授に深謝致します。

文献

- 1) Hirai K, Suzue S, Irikura T, et al.: Mutations producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 582~586, 1987
- 2) Fukuda H, Hosaka H, Hirai K, et al.: New norfloxacin resistance gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1757~1761, 1990

- 3) Rella M, Hass D: Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO to nalidixic acid and low levels of β -lactam antibiotics: mapping of chromosomal genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 242~249, 1982
- 4) Masuda N, Sakagawa E, Ohya S: Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 645~649, 1995
- 5) Masuda N, Gotoh N, Ohya S, et al.: Quantitative correlation between susceptibility and OprJ production in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 909~913, 1996
- 6) 林 泉, 桜井雅紀, 一木昌郎, 他: MRSA と *P. aeruginosa* 複数菌感染症に対する Fosfomycin+Sulbactam/Cefoperazone 併用療法の基礎的・臨床的検討-I。 *Jap. J. Antibiotics* 47: 29~39, 1994
- 7) 林 泉, 大沼菊夫, 桜田 寧, 他: 呼吸器科領域における Norfloxacin と Fosfomycin との併用について。 *感染症学雑誌* 61: 1382~1394, 1987
- 8) Hosaka M, Gotoh N, Nishino T: Purification of a 54-kilodalton protein (OprJ) produced in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa* and production of a monoclonal antibody specific to OprJ. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1731~1735, 1995
- 9) Iyobe S, Tsunoda M, Mitsuhashi S: Cloning and expression in Enterobacteriaceae of the extended-spectrum β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* plasmid. *FEMS Microbiol Lett* 121: 175~180, 1994
- 10) 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
- 11) Lowry O H, Rosenbrough H J, Farr A L, et al.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265~275, 1951
- 12) Laemmli U K: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 227: 680~685, 1970
- 13) 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, 1990
- 14) Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, et al.: Transferable Imipenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 147~151, 1991
- 15) 中村隆雄: 酵素—反応速度と機構—。 p.87~152, 学会出版センター, 東京, 1981
- 16) 横田 健: 新しい抗生物質の使い方—その基礎理論—。 p.87~89, ライフサイエンス, 東京, 1992
- 17) 川畑敏枝, 蔵園瑞代, 新井田昌志, 他: *NalB* 型排出蛋白をもつ緑膿菌に対する FOM と β -ラクタム薬の併用効果。 *日化療会誌* 46: 17~22, 1998
- 18) 菅野由美子, 高田利彦, 菅野利恵, 他: *Pseudomonas aeruginosa* に対する各抗菌薬の殺菌力におよぼす Fosfomycin の影響。 *日化療会誌* 43: 735~741, 1995
- 19) 福島林造, 二木芳人: ホスホマイシン—新たな展開—, 清水喜八郎監修, p.73~77, 中外医学社, 東京, 1995
- 20) 山口明人, 澤井哲夫: 抗生物質の細菌細胞膜透過機構。 p.867~871, ファルマシア, 東京, 1992

Synergistic effects of fosfomycin in combination with β -lactam antibiotics against *nfxB*-type *Pseudomonas aeruginosa* with efflux proteins

Yoshihiro Takayama¹, Masashi Niida¹, Fumiya Hirano¹,
Naomasa Gotoh² and Takeshi Nishino²

¹Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, LTD. 760 Morooka-cho, Kohoku-ku, Yokohama 222-0002, Japan

²Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University

Multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*, which are characterized as overproducing OprJ (*nfxB*-type), are known to emerge after treatment with norfloxacin (NFLX). We obtained *P. aeruginosa* R 2 of a *nfxB*-type drug-resistant strain from *P. aeruginosa* PAO 1 on NFLX (3.13 μ g/ml) containing agar plates. Differing from *P. aeruginosa* PAO 1, *P. aeruginosa* R 2 was highly resistant against cefepime (CFPM), ceftazidime (CZOP), ceftazidime (CZOP), cefpirome (CPR), chloramphenicol (CP), tetracycline (TC) and quinolones. We studied the change in susceptibility of these strains against various β -lactams in the presence of fosfomycin. The synergistic effects could be observed on CFPM, CZOP, CPR, CAZ or NFLX in combination with fosfomycin. Although fosfomycin did not alter the amount of OprJ protein in *P. aeruginosa* R 2 it appears to accumulate the amount of CFPM in the periplasm of *P. aeruginosa* R 2. Thus, we concluded that fosfomycin potentiated the bactericidal activities of β -lactams against multi-drug-resistant *P. aeruginosa* not by reducing efflux proteins, but by increasing the drug concentration by some unknown mechanisms.