

Streptococcus pneumoniae におけるキノロン系薬の作用機序に関する遺伝学的解析

福田 秀行

杏林製薬株式会社中央研究所*

(平成 12 年 1 月 11 日受付・平成 12 年 2 月 24 日受理)

Streptococcus pneumoniae におけるキノロン系薬の作用機序の解析を目的とし、種々のキノロン系薬を用いて耐性変異株を段階的に作製し、それら変異株におけるキノロン系薬のターゲットをコードする遺伝子の変異を検索した。Trovafloxacin (TVFX), levofloxacin (LVFX), norfloxacin (NFLX), および ciprofloxacin (CPFX) によって選択された第 1 段階の変異株は, *parC* 遺伝子に単一の点変異を有していた。一方, sparfloxacin (SPFX) および gatifloxacin (GFLX) によって選択された変異株は, *gyrA* 遺伝子に単一の点変異を有していた。野生株と比較して *parC* 変異株はその選択薬剤である TVFX, LVFX, NFLX および CPFX に対してのみ感受性の低下が認められ, *gyrA* 変異株はその選択薬剤である GFLX および SPFX に対してのみ感受性の低下が認められた。第 2 段階の変異株においては, 使用するキノロン系薬にかかわらず *gyrA* 変異株からは *parC* 変異株が, *parC* 変異株からは *gyrA* 変異株が選択され, 結果としてすべての第 2 段階の変異株は, *gyrA*+*parC* の二重変異を有していた。これら第 2 段階の変異株は, 第 1 段階の変異株と比較して, すべてのキノロン系薬に対して感受性が低下していた。これらの結果は, 野生株における TVFX, LVFX, NFLX および CPFX の主たるターゲットはトポイソメラーズ IV であり, GFLX および SPFX の主たるターゲットは DNA ジャイレースであることを示唆している。また, 第 1 段階の *gyrA* 変異株および *parC* 変異株におけるキノロン系薬の主たるターゲットは, それぞれトポイソメラーズ IV および DNA ジャイレースであることを示唆している。これら第 1 段階および第 2 段階の変異株の選択に際して, 使用するキノロン系薬によって変異株の選択の難易に違いが認められた。さらには, 変異株を選択し難いキノロン系薬は, 得られた変異株に対する抗菌活性の低下の小さい傾向が認められた。これらの結果から, *in vitro* において耐性変異株を選択し難いキノロン系薬は, 菌体内において DNA ジャイレースとトポイソメラーズ IV を近いレベルで阻害する “Dual Target Quinolone” であることが考えられる。臨床より近年分離された *S. pneumoniae* 99 株について, キノロン系薬に対する感受性とそのターゲットの遺伝子変異を検討したところ, 93 株 (94%) がキノロン感受性株, 残る 6 株 (6%) がキノロン耐性株 (CPFX の MIC \geq 6.25 μ g/mL) であり, これらの耐性株のうち 5 株でキノロン系薬のターゲットをコードする遺伝子に変異が認められた。これらの結果は, 臨床より近年分離される *S. pneumoniae* において, キノロン系薬に対する耐性化率がまだ低いことを示している。今後, *S. pneumoniae* 感染症に対するキノロン系薬の臨床での使用に際しては, 抗菌活性, 体内動態および安全性を考慮に入れることはもちろん, その有効性を持続させるために, 起因菌を容易に耐性化させないことが重要であり, 薬剤による耐性菌選択の難易も考慮していく必要があるものと考えられる。

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, キノロン系薬, 作用機序, DNA ジャイレース, トポイソメラーズ IV

Streptococcus pneumoniae は市中肺炎, 急性中耳炎および細菌性髄膜炎の起因菌として临床上重要な菌種の 1 つである。近年, ペニシリン耐性の *S. pneumoniae* (PRSP) が世界的な広がりを見せており, 本邦においても臨床より分離される *S. pneumoniae* の 40% 以上はペニシリン中等度ならびに高度耐性株の PRSP であるとの報告がなされている¹⁻³⁾。PRSP の蔓延に伴い, β -ラクタム系薬による化学療法が難渋する *S. pneumoniae* 感染症も報告されており^{3,4)}, 临床上の大きな問題となっている。こうした状況下, *S.*

pneumoniae による感染症治療において β -ラクタム系薬以外の抗菌薬の必要性が高まってきている。近年, *S. pneumoniae* に対して優れた活性を有するキノロン系抗菌薬の開発が進められており, PRSP を含む *S. pneumoniae* 感染症の治療薬の 1 つとして期待されている。現在, これらキノロン系薬の *S. pneumoniae* に対する作用機序については, さまざまな角度からの研究が進められているところである。

キノロン系薬の細菌におけるターゲットは DNA ジャイレースおよびトポイソメラーズ IV (トポIV) の 2 つである。DNA

ジャイレースおよびトポIVはそれぞれ染色体DNAの複製および複製後の分配に必須であり、キノロン系薬はこれらの酵素反応を阻害することによって抗性を示す。これら2つのターゲットのうち、キノロン系薬に対してより感受性の高い酵素(主たるターゲット)によって細菌のキノロン系薬に対する感受性が主に決定されるものと考えられている。大腸菌においてはDNAジャイレースがキノロン系薬の主たるターゲットと考えられており⁵⁾、黄色ブドウ球菌および*S. pneumoniae*などのグラム陽性菌においてはトポIVが主たるターゲットであると考えられている⁶⁻¹⁴⁾。最近、sparfloxacinの*S. pneumoniae*における主たるターゲットがDNAジャイレースであるとの報告がなされ¹⁵⁾、*S. pneumoniae*においてはキノロン系薬によってその主たるターゲットが異なることが明らかとなっている。Sparfloxacin以外では、clinafloxacinの主たるターゲットがDNAジャイレースであることが報告されている¹⁶⁾。しかし、それら以外のキノロン系薬の主たるターゲットに関する報告は少ない。そこで、*S. pneumoniae*のキノロン耐性変異株および臨床分離株に関してキノロン系薬のターゲットであるDNAジャイレースのAおよびBサブユニットをそれぞれコードする*gyrA*および*gyrB*遺伝子、ならびにトポIVのCおよびEサブユニットをそれぞれコードする*parC*および*parE*遺伝子の解析を行い、種々のキノロン系薬の主たるターゲットならびにターゲットに対する作用について、既報¹⁷⁾の見知とも合わせ考察を行った。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤

Gatifloxacin (GFLX), trovafloxacin (TVFX), sparfloxacin (SPFX), levofloxacin (LVFX), norfloxacin (NFLX) および ciprofloxacin (CPFX) は、いずれも杏林製薬株式会社において合成されたものを使用した。

2. 使用菌株および耐性変異株の選択

キノロン感受性の*S. pneumoniae* IID 553株(日本細菌学会より分譲)を用いた。第1段階の耐性変異株は、GFLX, TVFX, SPFX, LVFX, NFLX および CPFX の2, 4, 8, および16×MICを含む5%馬脱繊維血添加ミューラーヒントン寒天培地上にIID 553株を播種し、37°C, 48時間以上培養することによって選択した。得られた第1段階の変異株から、同様に第2段階の変異株を選択した。臨床分離株は日本国内各地の病院より1996年に分離された99株を用いた。これら臨床分離株は順天堂大学医学部細菌学教室より分与を受けた。

3. キノロン耐性決定領域(QRDR)^{18,19)}を含む遺伝子領域の増幅

DNAジャイレースのGyrAおよびGyrBサブユニットをそれぞれコードする*gyrA*および*gyrB*遺伝子、ならびにトポIVのParCおよびParEサブユニットをそれぞれコードする*parC*および*parE*遺伝子のQRDRを含む遺伝子領域をPCRにて増幅した。プライマーとしてPanらが報告¹³⁾している塩基配列を有するオリゴヌ

クレオチドを用いた。これらのプライマーは、増幅された遺伝子が*gyrA*, *gyrB*, *parC* および *parE* のQRDRに相当する領域を含むように設計されている。PCRの条件は、DNA変性(94°C, 30秒), アニール(55°C, 30秒), プライマーの伸長(72°C, 2分)とし、25サイクル行った。

4. 塩基配列の決定

増幅された遺伝子を鋳型とし、5'末端をビオチン化したオリゴヌクレオチドをプライマーとするサイクルシーケンシングを行った。さらにポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、フォトープ6Kディテクションキット(ニューイングランドバイオラボ社)およびX線フィルムを用い、化学発光により各遺伝子のQRDRの塩基配列を決定した。5'末端をビオチン化したプライマーは既報¹⁷⁾にもとづき、*gyrA*用として5'-AAATCTGCTCGTATTACAGGGGATG-3', *gyrB*用として5'-CAGGGAACTAGCAGACTGTTCTTC-3', *parC*用として5'-GACAAGAGCTACCGTAAGTCGGCCAAG-3' および *parE*用として5'-CAGCCCAATCTAAGAATCTGCTAAG-3'を用いた。

5. 最小発育阻止濃度(MIC)の測定

ミューラーヒントン寒天培地を用いた寒天平板希釈法²⁰⁾にもとづき、菌を37°Cで18~20時間培養した後の発育を阻害するもっとも低い薬剤濃度をMICとした。

II. 結 果

1. 第1段階変異株における遺伝子変異とキノロン感受性

耐性変異株の出現頻度をTable 1に示す。第1段階の耐性変異株は16×MIC以下のSPFX, 4×MIC以下のTVFX, CPFX および NFLX, 2×MICのLVFXの選択によって得られた。2×MIC以上のGFLXの選択では耐性変異株は得られず、1×MICの選択によってのみ1株の耐性変異株が得られた。このようにキノロン系薬によって耐性変異株の選択のしやすさが異なっていた。

各薬剤で選択された変異株を無作為に選び、*gyrA*, *gyrB*, *parC* および *parE* 遺伝子のQRDRの変異の解析と各種キノロン系薬に対する感受性の測定を行った。TVFXで選択された変異株においては、親株および他の変異株より小さなコロニーを形成する株が混在していたため、ノーマル形状のコロニーを形成する株と小さなコロニーを形成する株のそれぞれ数株ずつについて解析を行った。また、GFLXで選択された株は1株であったため、この1株について解析を行った。

変異株における各遺伝子の変異とキノロン感受性から、第1段階の変異株は3つのタイプに分類された(Table 2)。第1のタイプの変異株は、TVFX, LVFX, NFLX および CPFX によって選択され、トポIVのParCサブユニットをコードする*parC* 遺伝子のQRDRに単

Table 1. Frequencies of appearance of the mutant strains by selection with various quinolones

Mutants	Selecting quinolone	Frequency at the following multiple of the MIC:			
		2×MIC	4×MIC	8×MIC	16×MIC
First-step mutants					
from wild-type strain					
	GFLX	<1.1×10 ⁻⁹	<1.1×10 ⁻⁹	<1.1×10 ⁻⁹	<1.1×10 ⁻⁹
	SPFX	>2.2×10 ⁻⁶	>2.2×10 ⁻⁶	>2.2×10 ⁻⁶	1.1×10 ⁻⁷
	TVFX	>2.2×10 ⁻⁶	6.2×10 ⁻⁸	<1.1×10 ⁻⁹	<1.1×10 ⁻⁹
	LVFX	1.5×10 ⁻⁷	<1.1×10 ⁻⁹	<1.1×10 ⁻⁹	<1.1×10 ⁻⁹
	CPFX	>2.2×10 ⁻⁶	1.1×10 ⁻⁹	<1.1×10 ⁻⁹	<1.1×10 ⁻⁹
	NFLX	2.6×10 ⁻⁷	2.2×10 ⁻⁹	<1.1×10 ⁻⁹	<1.1×10 ⁻⁹
Second-step mutants					
from <i>gyrA</i> mutant					
	GFLX	4.3×10 ⁻⁷	<2.9×10 ⁻⁹	<2.9×10 ⁻⁹	<2.9×10 ⁻⁹
	SPFX	>2.9×10 ⁻⁶	>2.9×10 ⁻⁶	1.2×10 ⁻⁸	<2.9×10 ⁻⁹
	TVFX	2.1×10 ⁻⁷	1.3×10 ⁻⁷	1.2×10 ⁻⁷	2.0×10 ⁻⁷
	LVFX	>2.9×10 ⁻⁶	6.6×10 ⁻⁷	4.8×10 ⁻⁷	<2.9×10 ⁻⁹
	CPFX	>2.9×10 ⁻⁶	4.4×10 ⁻⁷	3.1×10 ⁻⁷	3.2×10 ⁻⁸
	NFLX	>2.9×10 ⁻⁶	1.1×10 ⁻⁸	<2.9×10 ⁻⁹	<2.9×10 ⁻⁹
from <i>parC</i> mutant					
	GFLX	3.7×10 ⁻⁷	2.1×10 ⁻⁷	8.5×10 ⁻⁸	2.7×10 ⁻⁹
	SPFX	>2.7×10 ⁻⁶	>2.7×10 ⁻⁶	>2.7×10 ⁻⁶	>2.7×10 ⁻⁶
	TVFX	>2.7×10 ⁻⁶	2.6×10 ⁻⁷	2.0×10 ⁻⁷	8.6×10 ⁻⁸
	LVFX	>2.7×10 ⁻⁶	2.2×10 ⁻⁷	8.1×10 ⁻⁸	<2.7×10 ⁻⁹
	CPFX	>2.7×10 ⁻⁶	1.5×10 ⁻⁷	<2.7×10 ⁻⁹	<2.7×10 ⁻⁹
	NFLX	<2.7×10 ⁻⁹	<2.7×10 ⁻⁹	<2.7×10 ⁻⁹	<2.7×10 ⁻⁹

GFLX: gatifloxacin, SPFX: sparfloxacin, TVFX: trovafloxacin, LVFX: levofloxacin, CPFX: ciprofloxacin, NFLX: norfloxacin

一の点変異を有していた。これら *parC* 変異株は選択薬剤である TVFX, LVFX, NFLX および CPFX に対する感受性が野生株と比較して、それぞれ 4, 2, 4 および 4 倍低下していた。しかし、SPFX および GFLX に対する感受性の低下は認められなかった。

第 2 のタイプの変異株は SPFX および GFLX によって選択され、DNA ジャイレースの *GyrA* サブユニットをコードする *gyrA* 遺伝子の QRDR に単一の点変異を有していた。これら *gyrA* 変異株は選択抗菌薬である GFLX および SPFX に対し、野生株と比較して 2 および 8 倍の感受性低下が認められた。一方、TVFX, LVFX, NFLX および CPFX に対する感受性の低下は認められなかった。

第 3 のタイプの変異株は TVFX によって選択され、それらの形成するコロニーは小さく、TVFX および SPFX にのみに耐性を示した。また各ターゲットをコードする遺伝子の QRDR に変異は認められなかった。

2. 第 2 段階変異株における遺伝子変異とキノロン感受性

第 2 段階の変異株を選択するにあたって、元株となる第 1 段階の変異株として *gyrA* 株 (Ser 81→Phe) および *parC* 株 (Ser 79→Tyr) をそれぞれ用いた。第 2 段階の変異株は、*gyrA* 変異株から GFLX の 2×MIC で選択され、他のキノロン系薬では 4×MIC あるいはそれ以上の濃度で選択された。*parC* 変異株からは NFLX によって変異株は選択されなかったが、それ以外のすべての薬剤で 4×MIC あるいはそれ以上の濃度で選択され

た。第 1 段階の変異株の選択と同様にキノロン系薬によって耐性変異株の選択の難易が異なっていた (Table 1)。

種々のキノロン系薬によって選択された第 2 段階の変異株 2 株ずつについてターゲットをコードする各遺伝子を解析したところ、すべての株において *gyrA* + *parC* の二重変異が認められた (Table 2)。すなわち、*parC* 変異株からは *gyrA* 変異株が選択され、*gyrA* 変異株からは *parC* 変異株が選択された。

これら変異株のキノロン系薬に対する感受性は、それぞれが有する変異によって若干異なっていた (Table 2)。*gyrA* (Ser 81→Phe) + *parC* (Asp 83→Tyr) の二重変異を有する株は、GFLX, TVFX, LVFX および CPFX に対する感受性が他の第 2 段階変異株と比較してやや高く、*gyrA* (Glu 85→Lys) + *parC* (Ser 79→Tyr) の二重変異を有する株は、SPFX および LVFX に対する感受性が他の第 2 段階変異株と比較して低かった。

3. 臨床分離株における遺伝子変異とキノロン感受性

Table 3 に臨床分離株 99 株のキノロン系薬に対する感受性を示した。MIC₉₀ および MIC₅₀ 値をもとに活性を比較すると、TVFX がもっとも優れ、次いで GFLX および SPFX となり、LVFX, CPFX および NFLX はこれら 3 抗菌薬より活性の低い傾向が認められた。また、臨床分離株 (99 株) は CPFX の感受性により、キノロン感受性株 (CPFX の MIC が 3.13 μg/mL 以下, 93 株), 中等度耐性株 (CPFX の MIC が 6.25 μg/mL, 4

Table 2. Gene mutations in the quinolone resistance-determining region and antibacterial activity of various quinolones against the resistant mutants

Strain	Selecting quinolone (conc. $\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a	No. of strains	Mutation (codon)		MIC ($\mu\text{g/mL}$)					
			<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	GFLX	SPFX	TVFX	LVFX	CPFX	NFLX
Wild-type strain (IID 553)			none	none	0.39	0.39	0.10	0.78	0.78	6.25
First-step mutants from wild-type strain										
	TVFX (0.20)	3	none	Ser 79(TCT)→Tyr(TAT)	0.39	0.39	0.39	1.56	3.13	25
	LVFX (3.13)	1	none	Asp 83(GAT)→Asn(AAT)	0.39	0.39	0.39	1.56	3.13	25
		2	none	Ser 79(TCT)→Tyr(TAT)	0.39	0.39	0.39	1.56	3.13	25
	NFLX (12.5 or 25)	3	none	Ser 79(TCT)→Tyr(TAT)	0.39	0.39	0.39	1.56	3.13	25
	CPFX (1.56)	1	none	Ser 79(TCT)→Tyr(TAT)	0.39	0.39	0.39	1.56	3.13	25
		2	none	Asp 83(GAT)→Asn(AAT)	0.39	0.39	0.39	1.56	3.13	25
	SPFX (3.13 or 6.25)	3	Ser 81(TCC)→Phe(TTC)	none	0.78	3.13	0.10	0.78	0.78	6.25
	GFLX (0.39)	1	Ser 81(TCC)→Tyr(TAC)	none	0.78	3.13	0.10	0.78	0.78	6.25
	TVFX (0.20 or 0.39)	3	none	none	0.39	0.78	0.39	0.78	0.78	6.25
Second-step mutant from <i>gyrA</i> mutant										
	TVFX (1.56)	1	Ser 81(TCC)→Phe(TTC)	Ser 79(TCT)→Tyr(TAT)	6.25	12.5	6.25	25	25	50
		1	Ser 81(TCC)→Phe(TTC)	Ser 79(TCT)→Phe(TTT)	6.25	12.5	6.25	25	25	50
	LVFX (6.25)	2	Ser 81(TCC)→Phe(TTC)	Ser 79(TCT)→Phe(TTT)	6.25	12.5	6.25	25	25	50
	NFLX (25)	1	Ser 81(TCC)→Phe(TTC)	Ser 79(TCT)→Tyr(TAT)	6.25	12.5	6.25	25	25	50
		1	Ser 81(TCC)→Phe(TTC)	Asp 83(GAT)→Tyr(TAT)	3.13	12.5	3.13	12.5	12.5	50
	CPFX (12.5)	2	Ser 81(TCC)→Phe(TTC)	Ser 79(TCT)→Phe(TTT)	6.25	12.5	6.25	25	25	50
	SPFX (25)	2	Ser 81(TCC)→Phe(TTC)	Ser 79(TCT)→Tyr(TAT)	6.25	12.5	6.25	25	25	50
	GFLX (1.56)	2	Ser 81(TCC)→Phe(TTC)	Ser 79(TCT)→Tyr(TAT)	6.25	12.5	6.25	25	25	50
from <i>parC</i> mutant										
	TVFX (6.25)	2	Glu 85(GAA)→Lys(AAA)	Ser 79(TCT)→Tyr(TAT)	6.25	50	6.25	50	25	50
	LVFX (12.5)	2	Glu 85(GAA)→Lys(AAA)	Ser 79(TCT)→Tyr(TAT)	6.25	50	6.25	50	25	50
	CPFX (12.5)	2	Ser 81(TCC)→Phe(TTC)	Ser 79(TCT)→Tyr(TAT)	6.25	12.5	6.25	25	25	50
	SPFX (6.25)	2	Glu 85(GAA)→Lys(AAA)	Ser 79(TCT)→Tyr(TAT)	6.25	50	6.25	50	25	50
	GFLX (3.13)	1	Glu 85(GAA)→Lys(AAA)	Ser 79(TCT)→Tyr(TAT)	6.25	50	6.25	25	25	50
		1	Ser 81(TCC)→Phe(TTC)	Ser 79(TCT)→Tyr(TAT)	6.25	12.5	6.25	50	25	50

^aConcentration for selection. All of the strains possessed no mutations in the QRDR of *gyrB* and *parE* genes. The codon positions of *gyrA* and *parC* are designated according to the numbering of Balas, et al.²⁶⁾ and Pan and Fisher²⁷⁾, respectively.

GFLX: gatifloxacin, SPFX: sparfloxacin, TVFX: trovafloxacin, LVFX: levofloxacin, CPFX: ciprofloxacin, NFLX: norfloxacin

Table 3. Susceptibility of 99 clinical isolates to various quinolones

Quinolone	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	range	50%	90%
GFLX	0.05 - 6.25	0.39	0.78
SPFX	0.05 - 25	0.39	0.78
TVFX	0.025 - 6.25	0.20	0.39
LVFX	0.05 - 25	1.56	1.56
CPFX	0.05 - 25	1.56	3.13
NFLX	0.20 - 50	6.25	12.5

GFLX: gatifloxacin, SPFX: sparfloxacin, TVFX: trovafloxacin, LVFX: levofloxacin, CPFX: ciprofloxacin, NFLX: norfloxacin

株), 高度耐性株 (CPFX の MIC が $25 \mu\text{g/ml}$, 2 株) の 3 つのグループに分類された。なお, CPFX 感受性株の中に SPFX あるいは GFLX に耐性を示す *gyrA* タイプの株は認められなかった。

これら臨床分離株の中から, 感受性株より無作為に選択した 20 株, 中等度耐性株 4 株および高度耐性株 2 株についてキノロン系薬のターゲットである DNA ジャイレースおよびトポIVをコードする遺伝子の QRDR について解析を行った (Table 4)。キノロン感受性株 20 株において, 各遺伝子の QRDR に変異は認められなかった。一方, 中等度耐性株では *parC* に変異が認められた

株が2株, *parE* に変異が認められた株が1株, いずれの遺伝子の QRDR にも変異が認められなかった株が1株存在した。高度耐性株では2株とも, *parC* および *gyrA* に1か所ずつの変異が認められた。これら中等度耐性株および高度耐性株のキノロン感受性は, それぞれ *in vitro* で選択された第1段階変異株および第2段階変異株のキノロン感受性と類似していた (Table 4)。

III. 考 察

Panらは, SPFX および CPFIX によってそれぞれ選択された *gyrA* および *parC* 変異株が, CPFIX および SPFX に対してそれぞれ交叉耐性を示さないことから, SPFX の *S. pneumoniae* (野生株) における主たるターゲットは DNA ジャイレースであり, CPFIX の主たるターゲットはトポIVであることを明らかにしている¹⁵⁾。本研究においても, SPFX によって野生株から *gyrA* 変異株が選択され, CPFIX によって *parC* 変異株が選択されており, これら *gyrA* および *parC* 変異株は CPFIX および SPFX それぞれに耐性を示さなかった。これらの結果は, SPFX の *S. pneumoniae* (野生株) における主たるターゲットは DNA ジャイレースであり, CPFIX の主たるターゲットはトポIVであるとする Panらの説¹⁵⁾を支持するものである。同様の理由から, CPFIX に加え TVFX, LVFX および NFLX の野生株における主たるターゲットはトポIVであり, SPFX に加え GFLX の主たるターゲットは DNA ジャイレースであると考えられる。

第1段階の *gyrA* および *parC* 変異株からは, NFLX を除きいずれのキノロン系薬で選択しても, すでに有する変異に加え, それぞれ *parC* および *gyrA* の変異した第2段階の変異株が選択された。また, これら二重変異を有する第2段階変異株のすべてのキノロン系薬に対する感受性は, 第1段階の株と比較して低下していた。これらの結果から, 第1段階の *parC* 変異株における試験したすべてのキノロン系薬の主たるターゲットは

DNA ジャイレースであり, *gyrA* 変異株における主たるターゲットはトポIVであることが示唆される。

第2段階の変異株のキノロン感受性は, それぞれが有する変異によって若干異なっていた。*gyrA* (Ser 8:→Phe)+*parC* (Asp 83→Tyr) の二重変異を有する株においては, GFLX, TVFX, LVFX および CPFIX に対する感受性が他の第2段階変異株と比較してやや高く, *gyrA* (Ser 79→Tyr)+*parC* (Glu 85→Lys) の二重変異を有する株においては, SPFX および LVFX に対する感受性が他の第2段階変異株と比較して低かった。このようなターゲット酵素の変異パターンとキノロン系薬感受性の違いは, キノロン系薬の分子レベルにおける作用機序を解析する上で興味を持たれる現象である。

本研究では, キノロン系薬によって耐性変異株の選択の難易が異なることを明らかとした。また, 耐性変異株を選択し難い薬剤は, その薬剤で選択される耐性変異株に対する活性の低下も小さい傾向にあった。GFLX を例に見てみると, 第1段階の変異株は2×MIC以上の濃度では選択されず, 1×MICの低濃度でのみ選択された。また GFLX で選択される *gyrA* 変異株に対する感受性の低下は, MICで2倍であった。これらの結果は, GFLX が DNA ジャイレースおよびトポIVの2つのターゲットを近いレベルで阻害することに起因するものと考えられる (Fig. 1)。すなわち, GFLX は, *gyrA* 変異株において感受性を規定する野生型のトポIVを, 野生株において感受性を規定する野生型の DNA ジャイレースに近いレベルで阻害するため, 耐性株 (*gyrA* 変異株) を選択し難いものと考えられる。また, たとえ *gyrA* 変異株が選択されたとしても, 上述のとおり *gyrA* 変異株において GFLX の感受性を規定する主たるターゲットは, 変異型の DNA ジャイレースでなく野生型のトポIVとなるため, 耐性変異株 (*gyrA* 変異株) における感受性の低下は, MICで1管程度となるものと考えられる。第2段階の変異株選択に際しても, NFLX では *parC* 変異株

Table 4. Gene mutations in the quinolone resistance-determining region and antibacterial activity of various quinolones against the ciprofloxacin-resistant (MIC≥6.25 µg/mL) clinical isolates

Strain	Gene:	Mutation	MIC (µg/mL)					
			GFLX	SPFX	TVFX	LVFX	CPFX	NFLX
No. 7		none	0.78	0.39	0.39	1.56	6.25	25
No. 15	<i>parC</i> :	Ser 79 (TCT) →Phe (TTT)	0.78	1.56	0.78	1.56	6.25	50
No. 82	<i>parC</i> :	Ser 79 (TCT) →Phe (TTT)	0.39	0.78	0.20	3.13	6.25	50
No. 88	<i>parE</i> :	Lys 442 (AAA) →Arg (GAA)	0.78	0.78	0.39	1.56	6.25	50
No. 55	<i>parC</i> :	Ser 79 (TCT) →Tyr (TAT)	6.25	25	6.25	25	25	50
	<i>gyrA</i> :	Ser 81 (TCC) →Tyr (TAC)						
No. 58	<i>parC</i> :	Ser 79 (TCT) →Phe (TTT)	3.13	12.5	3.13	12.5	25	25
	<i>gyrA</i> :	Ser 81 (TCC) →Phe (TTC)						

GFLX: gatifloxacin, SPFX: sparfloxacin, TVFX: trovafloxacin, LVFX: levofloxacin, CPFX: ciprofloxacin, NFLX: norfloxacin

から選択されず、また、第1段階の *parC* 変異株と第2段階の *parC* + *gyrA* 二重変異株の NFLX に対する感受性の差は MIC で1管と小さかった。これらの結果は、NFLX が *parC* 変異株の有する変異型トポIVと野生型 DNA ジャイレースを近いレベルで阻害している可能性を示している。最近、DNA ジャイレースおよびトポIVの2つのターゲットを近いレベルで阻害するシタフロキサシンにおいても、耐性変株を選択し難いことが報告されており²¹⁾、耐性菌の選択の難易は、菌体内における2つのターゲット酵素に対するキノロン系薬の阻害の差に依存している可能性が考えられる。

今回解析した臨床分離株 (99株) におけるペニシリン中等度耐性を含む PRSP (PCG の MIC が 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上) の占める割合は 50% 以上であり、近年、臨床で分離される *S. pneumoniae* のペニシリン感受性を反映しているものと考えられる。これらの臨床分離株の中で 93/99 株 (94%) を占めるのはキノロン感受性株であり、多くの株がキノロン系薬に感受性を保持していることが明らかとなった。これら臨床より分離されたキノロン感受性株から無作為に選択した 20 株では、*gyrA*, *gyrB*, *parC* および *parE* 遺伝子の QRDR に変異は認められなかった。

一方、4/99 株 (4%) 存在した中等度耐性株では、2 株で *parC* 変異が認められた。これらの変異は、*in vitro* で選択されたキノロン耐性変異株において認められた変異と同部位の変異であり、この変異にもとづくトポIVの変化がキノロン耐性に関与しているものと考えられる。また、中等度耐性株 1 株では *parE* 遺伝子の QRDR に変異が認められた。*S. pneumoniae* においては、これとは異なる部位ではあるが *parE* 遺伝子の QRDR 変異によってキノロン系薬耐性が付与されることが報告²²⁾

されており、今回確認された *parE* 変異もキノロン耐性に関与している可能性が考えられる。残りの 1 株においては、ターゲットをコードする遺伝子に変異は認められなかった。また、TVFX の選択によって得られた第1段階の変異株の中にも、ターゲットをコードする遺伝子に変異が認められない株が存在していた。*S. pneumoniae* においても、ターゲット変異以外のキノロン耐性機構としてキノロン系薬の排出機構の存在が明らかとなっており²³⁻²⁵⁾、これら耐性株におけるキノロン耐性も薬剤の排出によって獲得されている可能性が考えられる。

高度耐性株においては 2 株とも *parC* および *gyrA* に 1 か所ずつの変異が認められた。これらの変異は *in vitro* で得られた第2段階変異株における遺伝子変異と同部位における変異であり、各抗菌薬に対する感受性も第2段階変異株と類似することから、これら高度耐性株においてはトポIVおよび DNA ジャイレースの二重変異によってキノロン系薬に対して高度耐性を獲得しているものと考えられる。

これらの遺伝解析より、臨床分離の *S. pneumoniae* のキノロン耐性の獲得について、次のような過程が考えられる。これまでに日本で臨床使用されてきたキノロン系薬の多く (NFLX, CPF, LVFX など) はトポIVを主たるターゲットとする抗菌薬である。こうした抗菌薬の臨床での使用により、まず *parC* 変異株が選択され、さらにキノロン系薬によるもう1段階の選択によって *gyrA* 変異が付加され、*parC* + *gyrA* の二重変異を有するキノロン高度耐性株が出現したものと考えられる。

現在、*S. pneumoniae* を中心とする呼吸器感染症の起因菌に対して優れた活性を有するいくつかのキノロン系薬の開発が進められている。PRSP の蔓延などの状況とも相まって、呼吸器感染症に対するキノロン系薬の使

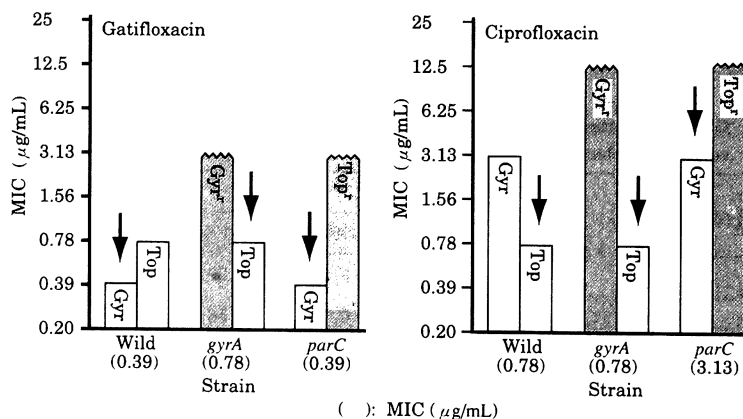


Fig. 1. Model of the target-inhibition of gatifloxacin and ciprofloxacin. Arrows indicate the primary targets of the agents in each strain. The MICs of the agents seem to be mainly determined by the inhibition of the primary targets. Top, wild-type topoisomerase IV; Gyr, wild-type DNA gyrase; Top', singly mutated topoisomerase IV; Gyr', singly mutated DNA gyrase.

用頻度が増加する可能性が考えられる。呼吸器感染症でのキノロン系薬の使用を考えた場合に抗菌活性、体内動態および安全性を考慮に入れることはもちろん、その有効性を維持させるために起因菌を容易に耐性化させないことが重要と考えられる。現状でのキノロン系薬に対する *S. pneumoniae* の耐性化率はまだ低く、キノロン系薬に耐性化させないためにも耐性変異株を選択し難い薬剤を使用していく必要があるものと考えられる。本研究においては、作用機序の観点から *in vitro* で耐性菌を選択し難いキノロン系薬として、菌体内における DNA ジャイレースとトポⅣの双方を近いレベルで阻害する“Dual Target Quinolone”を提唱した。今後は、酵素学的な解析を進めるとともに、*in vivo* における *S. pneumoniae* の耐性化についてもキノロン系薬の作用機序との関連を検討していく必要があるものと考えられる。

謝 辞

本研究は、上田泰記念感染症・化学療法研究奨励賞のご支援により、遂行されたことをここに記すとともに、東京慈恵会医科大学名誉教授 上田 泰先生をはじめ、関係諸先生方に心より感謝申し上げます。また、研究遂行にあたり、終始ご指導ならびにご助言をいただきました順天堂大学教授 平松啓一先生に深謝申し上げます。さらには、ご援助ならびにご協力をいただきました杏林製薬株式会社中央研究所の皆様に感謝の意を表します。

文 献

- 1) ペニシリン耐性肺炎球菌研究会: 全国各地で分離された肺炎球菌の疫学的研究。感染症誌 68: 1338~1351, 1994
- 2) 吉田 勇, 長野 馨, 木村美司, 他: 種々の臨床分離株の各種抗菌薬に対する感受性サーベイランス—その1 1996年度分離グラム陽性菌について—。Jpn. J. Chemother. 46: 324~342, 1998
- 3) 渡邊信介, 二木芳人, 吉田耕一郎, 他: 肺炎球菌感染症の臨床的検討。Jpn. J. Chemother. 47: 23~29, 1999
- 4) 有益 修, 目黒英典, 白石祐昭, 他: β -ラクタム系抗菌薬が無効であった肺炎球菌髄膜炎の1例。感染症誌 62: 682~683, 1988
- 5) Kumagai Y, Kato J, Hoshino K, et al.: Quinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* DNA topoisomerase IV *parC* gene. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 710~714, 1996
- 6) Blanche F, Cameron B, Bernard F-X, et al.: Differential behaviors of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* type II DNA topoisomerases. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2714~2720, 1996
- 7) Ferrero L, Cameron B, Manse B, et al.: Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. Mol. Microbiol. 13: 641~653, 1994
- 8) Ferrero, L, Cameron B, Crouzet J: Analysis of *gyrA* and *grlA* mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 1554~1558, 1995
- 9) Fukuda H, Hori S, Hiramatsu K: Antibacterial activity of gatifloxacin (AM-1155, CG 5501, BMS-206584), a newly developed fluoroquinolone, against sequentially acquired quinolone-resistant mutants and the *norA* transformant of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 1917~1922, 1998
- 10) Ng E Y, Trucksis M, Hooper D C: Quinolone resistance mutations in topoisomerase IV: Relationship to the *flqA* locus and genetic evidence that topoisomerase IV is the primary target and DNA gyrase is the secondary target of fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 1881~1888, 1996
- 11) Yamagishi J, Kojima T, Oyamada Y, et al.: Alterations in DNA topoisomerase IV *grlA* gene responsible for quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 1157~1163, 1996
- 12) Muñoz R, De La Campa A G: ParC subunit of topoisomerase of *Streptococcus pneumoniae* is a primary target of fluoroquinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2252~2257, 1996
- 13) Pan X S, Ambler J, Mehtar S, et al.: Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2321~2326, 1996
- 14) 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
- 15) Pan X S, Fisher L M: Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 471~474, 1997
- 16) Pan X S, Fisher L M: DNA gyrase and topoisomerase IV are dual targets of clinafloxacin action in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2810~2816, 1998
- 17) Fukuda H, Hiramatsu K: Primary targets of fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 410~412, 1999
- 18) 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
- 19) Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, et al.: Quinolone-resistance determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1647~1650, 1991
- 20) 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。Chemother. 29: 76~79, 1981
- 21) Onodera Y, Uchida Y, Tanaka M, et al.: Dual in-

- hibitory activity of sitafloxacin (DU-6859 a) against DNA gyrase and topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae*. J. Antimicrob. Chemother. 44: 533~536, 1999
- 22) Perichon B, Tankovic J, Courvalin P: Characterization of a mutation in the *parE* gene that confers fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 1166~1167, 1997
- 23) Baranova N N, Neyfakh A A: Apparent involvement of a multidrug transporter in the fluoroquinolone resistance of *Streptococcus pneumoniae*.
- 24) Brenwald N P, Gill M J, Wise R: Prevalence of a putative efflux mechanism among fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2032~2035, 1998
- 25) Gill M J, Brenwald N P, Wise R: Identification of an efflux gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 187~189, 1999
- 26) Balas D, Fernández-Moreira E, de la Campa A G: Molecular characterization of the gene encoding the DNA gyrase A subunit of *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. 180: 2854~2861, 1998
- 27) Pan X S, Fisher L M: Cloning and characterization of the *parC* and *parE* genes of *Streptococcus pneumoniae* encoding DNA topoisomerase IV: Role in fluoroquinolone resistance. J. Bacteriol. 178: 4060~4069, 1996

Genetic study of the mechanisms of action of fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*

Hideyuki Fukuda

Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd., 2399-1, Mitarai, Nogi, Shimotsuga, Tochigi 329-0114, Japan

Fluoroquinolone-resistant mutant strains were sequentially isolated from the wild-type *Streptococcus pneumoniae* IID 553 by selection with various fluoroquinolones. The first-step mutant strains, which were obtained by selection with trovafloxacin (TVFX), levofloxacin (LVFX), norfloxacin (NFLX) and ciprofloxacin (CPFX), possessed single point mutations in the *parC* gene. These *parC* mutant strains had decreased in susceptibilities to the selecting agents. Other first-step mutant strains, which were obtained by selection with gatifloxacin (GFLX) and sparfloxacin (SPFX), possessed single point mutations in the *gyrA* gene. These *gyrA* mutant strains had decreased in susceptibility to GFLX and SPFX but not to the other fluoroquinolones. The second-step mutant strains obtained from the first-step *parC* and *gyrA* mutant strains possessed additional *gyrA* and *parC* mutations, respectively. As a result, all of the second-step mutant strains possessed both *gyrA* and *parC* mutations. The susceptibilities of the second-step mutant strains to all of the fluoroquinolones were lower than those of the first-step mutant strains. These results suggest that in wild-type *S. pneumoniae* the primary target of TVFX, LVFX, NFLX and CPFX is topoisomerase IV, whereas the primary target of GFLX and SPFX is DNA gyrase, and in the *parC* and *gyrA* mutant strains the primary target of all the quinolones are DNA gyrase and topoisomerase IV, respectively. The frequencies of appearance of the first- and the second-step mutant strains were different among the fluoroquinolones used for selection. Moreover, the fluoroquinolones which selected mutant strains with a low frequency showed slight decreased activity against the mutant strains obtained. These results suggest that the fluoroquinolones which select the mutant strains with a low frequency inhibit both DNA gyrase and topoisomerase IV at nearly the same levels in *S. pneumoniae*. Among 99 recent clinical isolates of *S. pneumoniae*, only six fluoroquinolone-resistant (MIC of CPFX $\geq 6.25 \mu\text{g/mL}$) strains were observed. This indicates that fluoroquinolone-resistance is not prevalent in recent clinical isolates of *S. pneumoniae* in Japan. Therefore, in the clinical use of fluoroquinolones for the treatment of *S. pneumoniae* infections, it is important to consider the ability of the agents to select mutant strains in addition to the profiles of antipneumococcal activity, pharmacokinetics, and safety.