

Acinetobacter baumannii における キノロン系薬剤耐性機構の遺伝子解析

小林 大幹, 遠藤 優太, 藤本 和実, 眞野 容子, 古谷 信彦

文京学院大学大学院 保健医療科学研究科

要旨

Acinetobacter 属菌は自然環境中や病院環境中に広く分布する。*Acinetobacter spp.* の中で、*Acinetobacter baumannii* は臨床的に最も分離頻度が高い菌として知られている。本菌のうち広域β-ラクタム剤、アミノ配糖体、フルオロキノロンの3系統の薬剤に対して耐性を示す多剤耐性*A. baumannii* (Multi-Drug Resistant *Acinetobacter*:MDRA) の出現が問題となっている。*A. baumannii* は様々な耐性メカニズムを獲得する能力に長けており、先行研究において薬剤排出機構 (efflux pump) の効果について評価したところ、シプロフロキサシン (CPFX) において耐性効果が顕著に効果が認められた。そこで、リアルタイム PCR を用いて efflux pump 関連遺伝子の遺伝子発現量を測定するとともに、Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR (RFLP-PCR) 及びシーケンス解析を用いてフルオロキノロン耐性化に関連している *gyrA* 遺伝子の変異による薬剤親和性の低下と耐性発現の関連性について評価した。その結果、efflux pump 関連遺伝子の発現量は CPFX との組み合わせにおいて efflux pump の効果を認めた群と認めなかった群の2群間で有意差を認めた。このことから薬剤排出遺伝子である *adeB* の発現量増加による耐性化が示唆された。また、*gyrA* の変異は今回検討した全ての *A. baumannii* において確認され、フルオロキノロン系薬剤に対する耐性に関与している可能性が示唆された。これらの結果より、本研究は *A. baumannii* のフルオロキノロン系薬剤に対する耐性機構の基盤的研究になり得ると考えられる。

キーワード

Acinetobacter baumannii, CPFX, efflux pump, *adeB*, *gyrA*

序論

Acinetobacter 属菌は自然環境中や病院環境中に広く生息しているブドウ糖非発酵性グラム陰性桿菌である。*Acinetobacter* 属菌の中で、*Acinetobacter baumannii* は臨床的に最も分離頻度が高い菌である¹⁾。*A. baumannii* は様々な耐性機構を獲得する能力に長けており、近年は広域β-ラクタム剤、アミノ配糖体、フルオロキノロンの3系統の薬剤に対して耐性を示す多剤耐性*A. baumannii* (Multi-Drug Resistant *Acinetobacter*:MDRA) の出現が問題となっている²⁾。MDRA は感染防御機能の低下した患者に日和見感染を起し、肺炎などの呼吸器感染症、尿路感染症、敗血症など多彩な感染症を引き起こす。本菌は、2008年に福岡県³⁾、2009年には東京都、2010年には愛知県⁴⁾、2014年にも三重県でアウトブレイク事例が報告されている⁵⁾。*A. baumannii* における薬剤耐性機構には、主に修飾酵素・分解酵素による薬剤の不活性化、薬剤作用点の薬剤親和性の低下、細菌細胞外への能動的排出がある⁴⁾。上記耐性機構のうち細胞外での能動的排出は、単一の要因によって多剤耐性をもたらず⁶⁾。菌体内に流入した薬剤を菌体外へ排出することで

菌体内の薬剤濃度を低下させ耐性化を引き起こすエフラックスポンプ (efflux pump) と呼ばれる仕組みが最近注目されている。efflux pump の排出システムは大きく5つのファミリーに分類することができる。①ATPの加水分解をエネルギーとして異物を排出するABC型、②ナトリウムまたはプロトンを駆動力とするMATE型、③プロトン型駆動型で最も主要なファミリーであるMF型、④4回膜貫通型構造であるSMR型、⑤内膜コンポーネント、外膜コンポーネント、およびそれらをつないでいるサブユニットからなるRND型の5つの型から成り^{6,7)}、RND型が*A. baumannii* において最も耐性化に関与していると考えられている⁷⁾。また、その他の薬剤耐性機構には薬剤親和性の低下による耐性化がある。フルオロキノロン耐性は、標的酵素であるDNAジャイレースの変異により起こることが明らかになっており、DNAジャイレースのサブユニットをコードする*gyrA* 遺伝子のキノロン耐性決定領域 (QRDR) に変異が生じると、細菌は薬剤耐性化する⁸⁾。*A. baumannii* の*gyrA* 遺伝子に最も頻繁に変異するアミノ酸残基は、Ser-83およびGly-81で発生すると報告があり⁹⁾、先行研究において、遠藤らは*A. baumannii* の薬剤の能動的排出について評価した

ところ、シプロフロキサシン (Ciprofloxacin : CPFX) において顕著に排出ポンプの効果が認められたことを示唆している¹⁰⁾。そのため本研究では、*A. baumannii* における efflux pump 関連遺伝子である *adeB* 発現量の測定およびキノロン耐性機構である *gyrA* 遺伝子の変異による薬剤耐性化の評価を行った。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤

フルオロキノロン系薬剤のシプロフロキサシン (Ciprofloxacin : CPFX, 富士フィルム 和光純薬株式会社), レボフロキサシン (Levofloxacin : LVFX, LKT Laboratories)

2. 使用菌株

A. baumannii 標準株 ATCC17978, 19606, 緑膿菌標準株 ATCC27853, 臨床分離株として関東近郊で分離された *A. baumannii* 21 株 (BGU1446~1466) を使用した。尚, 臨床分離株の *A. baumannii* は *recA* 遺伝子を用いて簡易同定を実施した¹¹⁾。

3. 抗菌薬感受性試験

抗菌薬感受性試験は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に準拠し, 微量液体希釈法にて測定した¹²⁾。0.6-128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度勾配になるように薬剤のプレートを作成した。その後, 37°C の好気環境下で 18-24 時間培養後, CLSI の各ブレイクポイント判定基準に基づき感性 (S), 中間 (I), 耐性 (R) の判定をした¹²⁾。

4. PCR 法による遺伝子の検出

efflux pump 関連遺伝子の有無, *gyrA* 遺伝子の検出を目的として遺伝子解析を行った。DNA 抽出にはボイル法を用いた。efflux pump 関連遺伝子は *adeB* (F : GC-TACCTTCAGATGCAACCG, R : TAGATGCAGAGCTAGTC-CGC) プライマーを用いて, 熱変性 : 94°C · 30 秒, アニールリング : 60°C · 30 秒, 伸長反応 : 72°C · 1 分を 35 サイクル, 初期熱変性 : 94°C · 3 分, 最終伸長 : 72°C · 6 分の条件で行った。*gyrA* は (F : AAATCTGCCCGTGTCTGGT, R : GC-CATACCTACGCGGATACC) プライマーを用いて⁸⁾, 熱変性 : 95°C · 30 秒, アニールリング : 63°C · 30 秒, 伸長反応 : 72°C · 30 秒, を 30 サイクル, 初期変性 : 95°C · 1 分, 最終伸長 : 72°C · 10 分の条件で行った。その後, 2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い, エチジウムブロマイドで 15 分染色後, UV 照射にてバンドを確認した。陽性コント

ロールとして *A. baumannii* ATCC19606 を使用した。

5. Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) 法による薬剤排出遺伝子発現量の解析

qRT-PCR 法における薬剤排出遺伝子 (*adeB*) 発現量の解析に用いた菌株は, 先行研究¹⁰⁾ において efflux pump 阻害剤 (EPI) である Carbonyl Cyanide m-Chloro Phenylhydrazone (CCCP, コスモ・バイオ株式会社) で排出ポンプの効果が認められた *A. baumannii* 3 株と, 効果を認めなかった *A. baumannii* 3 株をランダムで選択した計 6 株を検討対照とした。CPFEX 濃度は MIC 値の範囲の最低値である 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 1 管差である 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定した CPFEX 含有 LB 培地にて 37°C, 18h 培養を行った。TaKaRa Nucleo Spin Plus (Takara Bio, 日本) を用いて, 前培養した細菌から total RNA を抽出した後, High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific, the United States) を用いて Oligo dT Primer と Random 6mers を含む Master Mix を添加し cDNA を合成した。milliQ 水にて希釈したものを検体として用いた。リアルタイム PCR 反応は, *adeB*, 16S rRNA (F : GGAGGAAGGTGGGGATGACG, R : ATGGT-GTGACGGGCGGTGTG) プライマーを用いて Power Track SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, the United States) およびリアルタイム PCR マシン [Step One Plus (Thermo Fisher Scientific, the United States)] を用いて行った。*adeB* の相対遺伝子発現を, リファレンス遺伝子である 16S rRNA 遺伝子に対して計算した。方法は $\Delta\Delta\text{CT}$ 法を用いてコントロールである ATCC17978 の発現量を基準として, 臨床分離株の *adeB* の発現量について相対的に測定した。得られた結果についてスチューデントの t 検定を行った。なお, $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。

6. Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR (RFLP-PCR) 法による *gyrA* 遺伝子の変異の評価

gyrA 遺伝子の変異の有無の検出を目的として行った。制限酵素として *HinfI* (Takara Bio, 日本) を用いた。上記の PCR 法によって生成された *gyrA* 遺伝子の PCR 産物と滅菌超純水の混合液 17 μL に, *HinfI* を 1 μL (10U/ μL), 10xH Buffer (Takara Bio, 日本) を 2 μL 分注し, 20 μL の反応液とし, Cool Stat にて 37°C, 1 時間インキュベーションを行った。その後, 2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い, エチジウムブロマイドで 15 分染色後, UV 照射にてバンドを確認した。本研究で用いた *gyrA* 遺伝子は, *A. baumannii* のコドン番号 83 番に変異を有しない場合では *HinfI* で処理を行うと 291bp と 52bp の 2 つの断片を生成する。し

かし *A. baumannii* のコドン番号 83 番に変異を有する場合は *Hin*I で処理を行うと元のバンドの位置である 343bp にバンドがみられる⁹⁾ (図 1)。また、精度管理株として *A. baumannii* ATCC19606 を用いた。

7. 遺伝子解析

gyrA 遺伝子内の変異を調べるため、PCR 法およびシーケンス解析による遺伝子解析を行った。解析における PCR 法および用いた *gyrA* プライマーは上記と同様である。PCR 法にてバンドを確認後、シーケンス解析を行い、BLAST を用いてアミノ酸置換を同定した。

II. 結果

1. 抗菌薬感受性試験

各薬剤における感受性試験の結果を示した (表 1)。CPFVX、LVFX の耐性株はそれぞれ、21 株、20 株であった。LVFX の耐性株の中等度耐性株は 1 株確認された。また、CPFVX においてはすべての株で MIC 値が 32 µg/ml 以上であり、高い耐性を示した。

表 1. 抗菌薬感受性試験の結果

| | MICs(µg/ml) | | | Susceptibility profile(n=21) | | |
|-------|-------------|-------|-------|------------------------------|---|----|
| | Range | MIC50 | MIC90 | S | I | R |
| CPFVX | >128 | 128 | 128 | - | - | 21 |
| LVFX | 4-64 | 16 | 16 | - | 1 | 20 |

CPFVX; ciprofloxacin, LVFX; Levofloxacin

2. PCR による耐性遺伝子の確認

RND 型の efflux pump 関連遺伝子である *adeB* は *A. baumannii* 21 株すべてにおいて検出が確認された。また、QRDR 遺伝子である *gyrA* についても *A. baumannii* 21 株すべてにおいて検出が確認された。

3. qRT-PCR 法による薬剤排出遺伝子発現量の解析

CPFVX (64 µg/mL) 添加時の結果を示す (図 2)。CPFVX との組み合わせで efflux pump の効果を認めた群と認めなかった群の 2 群間で有意差を認めた。

CPFVX (64 µg/mL) 添加時における各菌株の結果を示す (図 3)。BGU1457 では効果の認めない株と比べ発現量に有意差は認められなかった。

4. 遺伝子変異の解析

RFLP-PCR、シーケンス解析を行った結果を示す (表 2)。

表 2. RFLP-PCR 法およびシーケンス解析による *gyrA* の変異解析の結果

| | CPFVX | LVFX | <i>gyrA</i> | |
|------------|-------|------|--------------|-----------|
| | | | <i>Hin</i> I | |
| ATCC 19606 | 1 | 1 | - | - |
| BGU1457 | 128 | 16 | + | Ser → Leu |
| 1458 | 128 | 16 | + | Ser → Leu |
| 1464 | 128 | 16 | + | Ser → Leu |
| 1460 | 128 | 16 | + | Ser → Leu |
| 1462 | 128 | 16 | + | Ser → Leu |
| 1463 | >128 | 64 | + | Ser → Leu |

RFLP-PCR の結果において、すべての株に *Hin*I 処理により切断された断片は見られず、コドン番号 83 番にて変異の存在が示唆された (図 1)。また、精度管理株の *A. baumannii* ATCC19606 の *gyrA* の PCR 増幅産物では *Hin*I 処理により 291bp のバンドと 52bp のシグナルの弱いバンドの 2 つの断片が確認された (図 1)。更に、シーケンス解析により、すべての株において Ser → Leu の単一変異が認められた。

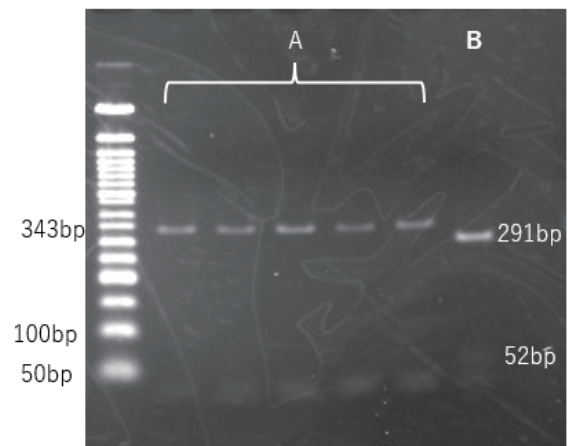


図 1 : *gyrA* における *Hin*I 処理による断片化

A: キノロン耐性 *A. baumannii* (変異が有る場合 343bp にバンドが見られる), B: *A. baumannii* ATCC19606 (変異が無い場合 291bp と 52bp に断片化が見られる)

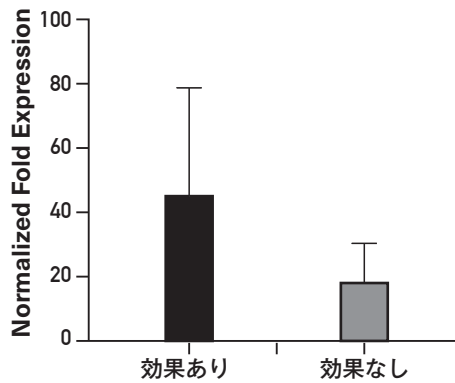


図2：Efflux pumpの効果による2群の排出遺伝子の発現
EPI効果ありの群とEPI効果なしの2群間では遺伝子発現量に有意な差を認めた。(p < 0.05)

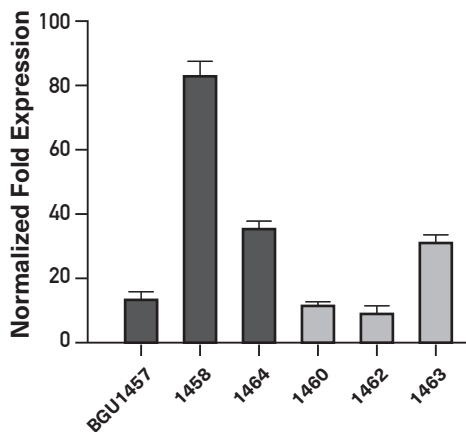


図3：CPFAX濃度64 µg/mLでの排出遺伝子の発現
BGU1457はEPIの効果なしの群と比較し遺伝子発現量に有意な差は認めなかった。

III. 考察

*A. baumannii*の薬剤耐性化には様々な薬剤耐性機構が知られている。今回の我々の研究では、薬剤排出機構である efflux pump と薬剤作用点の薬剤親和性の低下に関与する *gyrA* の変異について検討した。薬剤感受性試験の結果より、フルオロキノロン系薬剤に対しすべての菌株で耐性化が認められたため、フルオロキノロン系薬剤に対する耐性機構の存在が考えられる。

qRT-PCR法による薬剤排出遺伝子発現量の解析では、CPFAX (64 µg/mL) 添加時において、CPFAXとの組み合わせで efflux pump の効果を認めた群と認めなかった群の2群間で有意差を認めた。このことから薬剤排出遺伝子である *adeB* の発現量増加が耐性化の一因である可能性が示唆

された。しかし、各菌株と比較してBGU1457では効果のない株と比べ有意な増加は認められなかったことから、他の薬剤排出遺伝子によって耐性化が引き起こされた可能性が考えられる。efflux pumpによる耐性化はポンプ自体の個数が増える過剰発現により引き起こされていることが示唆されており^{13,14}、今後他の薬剤排出遺伝子について検討を行う必要がある。

遺伝子変異の解析では、すべての *A. baumannii* において RFLP-PCR、シーケンス解析よりコドン番号83番にて Ser → Leu の変異が確認され、フルオロキノロン系薬剤に対し耐性化を示していることより、Ser83 → Leu の変異は本研究で用いた *A. baumannii* に対するフルオロキノロンの薬剤親和性の低下をもたらす、耐性化を獲得している可能性が考えられる。また、CPFAXではすべての株において MIC が 32 µg/mL 以上であり、非常に高い耐性化を示していた。BGU1457, 1458, 1464 は先行研究において efflux pump 阻害剤 (EPI) である Carbonyl Cyanide m-Chloro Phenylhydrazone (CCCP, コスモ・バイオ株式会社) を用いた efflux pump の効果測定¹⁰では CPFAX 耐性に対する efflux pump の関与が認められており、efflux pump による耐性化と *gyrA* の Ser83 → Leu の変異による薬剤親和性の低下による耐性化が高度耐性化に関与していると考えられる。しかし、BGU1460, 1462, 1463 においては先行研究¹⁰において、efflux pump の効果は認められていないが、他の efflux pump の効果を認めた株と同様に CPFAX に対して高い耐性を示した。そのため、他の耐性機構の存在によって高度耐性化を示している可能性が示唆される。*A. baumannii* の QRDR の変異によるフルオロキノロン耐性化は QRDR 遺伝子である *gyrA* と *parC* の2重変異が高度耐性化を示すことから¹⁵、今後 *parC* や他の QRDR 遺伝子の変異による CPFAX の高度耐性化との関連について検討を行う必要がある。

本研究の遺伝子発現量および遺伝子変異の解析では、すべての *A. baumannii* において RFLP-PCR、シーケンス解析より上記で述べた変異が確認されており、それらの *A. baumannii* は LVFX においても耐性化を示した。そのため、LVFX の耐性化には *gyrA* の Ser83 → Leu の変異によって薬剤親和性が低下し耐性を示している事が示唆された。しかし、本研究では LVFX の efflux pump の効果測定は行っていないため今後 efflux pump による LVFX 耐性化と QRDR 遺伝子の変異による LVFX 耐性化の関連性の検討を行う必要がある。

結語

今回我々は、*A. baumannii* のフルオロキノロン系薬剤に対する薬剤排出機構および薬剤作用点の薬剤親和性の低下による耐性化について検討を行った。qRT-PCR法では、低濃度の薬剤暴露により efflux pump 関連遺伝子である *adeB* の発現量の有意差を認めた。RFLP-PCR およびシーケンス解析による遺伝子解析では、フルオロキノロン系薬剤である CPFX、LVFX 両薬剤の耐性化に *gyrA* の変異が関与している可能性が示唆された。従って本研究は *A. baumannii* のフルオロキノロン系薬剤に対する耐性機構の研究を進めていく上で基礎的研究になり得るといえる。

参考文献

- 1) 平潟洋一. 2011. アシネトバクター感染症. 感染症誌 85:340-346.
- 2) 厚生労働省: 薬剤耐性アシネトバクター感染症. <https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansen-shou11/01-05-43-01.html> (2023年4月6日現在)
- 3) 高田徹. 2010. 韓国からの持ち込み例を端緒とした多剤耐性 *Acinetobacter baumannii* によるアウトブレイク事例. IASR 31(7):197-198
- 4) 上地幸平, 切替照雄, 藤田次郎, 他. 2018. *Acinetobacter baumannii* における薬剤耐性とカルバペネマーゼ産生株の検出法. 日臨微誌 28(2):83-97
- 5) NIID 国立感染症研究所: 海外帰国患者より多剤耐性アシネトバクターおよび多剤耐性緑膿菌が同時に検出された事例に関する報告. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/dr-b/dr-b-iasrd/5037-kj4162.html> (2023年9月13日現在)
- 6) 西野邦彦, 山口明人. 2008. グラム陰性菌における薬剤排出システムの役割. 日本化学療法学会雑誌 56(4):443-452
- 7) C Xu, S R Bilya, W Xu. 2019. *adeABC* efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. New Microbe and New Infect, 30:100549
- 8) 山岸純一, 清水富尚. 2001. キノロン系薬剤耐性の分子遺伝学. 日本化学療法学会雑誌 49(8):469-484
- 9) Vila J, Ruiz J, etc. 1995. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 39: 1201-1203
- 10) 遠藤優太, 眞野容子, 古谷信彦. 2021. *Acinetobacter baumannii* における薬剤排出機構の解析. 生物試料分

析 44(5):160-164

- 11) 製品浄化技術基盤機構: PCR法による *Acinetobacter baumannii* の簡便検出法. <https://www.nite.go.jp/nbrc/safety/mlsa.html> (2023年4月17日現在)
- 12) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-eight Informational Supplement. 28: 42-44, 2018
- 13) Ardehali SH, Azimi T, Fallah. F: Role of efflux pumps in reduced susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter baumannii*. New Microbes and New Infections, 30: 100547, 2019.
- 14) Moubareck CA, Halat DH: Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. MDPI, 9: 119, 2020.
- 15) Abdollah Ardebili et al, Association between mutations in *gyrA* and *parC* genes of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and ciprofloxacin resistance, Iran J Basic Med Sci, 18(6), 2015-06, 623-626

Genetic Analysis of Quinolone Drug Resistance Mechanisms in *Acinetobacter baumannii*

Daiki Kobayashi, Yuta Endo, Kazumi Fujimoto, Yoko Mano, Nobuhiko Furuya

Graduate School of Health Care Science, Bunkyo Gakuin University

Abstract

Acinetobacter spp. are widely distributed in natural and hospital settings, and *A. baumannii* is the most frequently isolated species from clinical specimens. The emergence of multidrug-resistant *A. baumannii* (MDRA) strains, which are resistant to broad-spectrum β -lactams, aminoglycosides, and fluoroquinolones, has become a problem. Moreover, *A. baumannii* easily acquires new resistance mechanisms. A previous study showed that drug efflux pumps in *A. baumannii* mainly conferred resistance to ciprofloxacin. Therefore, we measured gene expression levels of efflux pump-related genes using real-time PCR. We also used restriction fragment length polymorphism-PCR (RFLP-PCR) and sequence analysis to evaluate the association between drug affinity and resistance with mutations in fluoroquinolone resistance-associated genes. Finally, we used real-time PCR to evaluate the association between drug affinity and resistance with mutations in the *gyrA* gene (which is associated with fluoroquinolone resistance). The results showed that the expression levels of efflux pump-related genes were significantly different between the two groups that did and did not show the effect of efflux pump in combination with CPFX. Notably, mutations in *gyrA* were identified in all the *A. baumannii* strains examined in this study, suggesting that *gyrA* may be involved in resistance to fluoroquinolones. These results could pave the way for further studies on the mechanism of resistance of *A. baumannii* to fluoroquinolones.

Key word ——— *Acinetobacter baumannii*, CPFX, efflux pump, *adeB*, *gyrA*

Bunkyo Journal of Health Science Technology vol.16: 7-12