

〈原著〉

*Acinetobacter baumannii*における薬剤排出機構の解析

遠藤 優太¹⁾、眞野 容子¹⁾、古谷 信彦¹⁾

Drug excretion mechanisms of *Acinetobacter baumannii*

Yuta Endo¹⁾, Yoko Mano¹⁾ and Nobuhiko Furuya¹⁾

Summary Multidrug-resistant *Acinetobacter* (MDRA) strains are important pathogens which utilize multiple resistance mechanisms. However, there are few reports on active drug excretion (efflux pump) as a resistance mechanism of MDRA clinical isolates in Japan. In this study, efflux pump resistance mechanisms were investigated in 21 *A. baumannii* strains of MDRA, which were simultaneously resistant to three types of antimicrobials, including broad-spectrum β -lactams, an aminoglycoside, and a fluoroquinolone. Carbonyl Cyanide *m*-Chlorophenylhydrazone, an efflux pump inhibitor, was used to investigate whether the efflux pump-related genes, *adeB* and *adeJ*, were involved in the development of resistance in these strains. Ciprofloxacin was the drug most affected (with regards to its efficacy) by these efflux pumps. Our results indicate that the efflux pump resistance mechanism is present in *A. baumannii* isolates in Japan. These results add to currently available knowledge on the resistance mechanisms in Japanese isolates.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, efflux pump, Carbonyl Cyanide *m*-Chlorophenylhydrazone

I. 緒言

アシネトバクターバウマニ (*Acinetobacter baumannii*) は好気性のグラム陰性桿菌であり、土壌や水中などの環境中に広く生息し、健常人の皮膚からも検出される¹⁾。*A. baumannii*は病院内にも存在し、時には院内感染、日和見感染の起因菌となる。*A. baumannii*の特徴は薬剤耐性メカニズムを集積する能力に長けている。近年では広域 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*Acinetobacter*が出現しており、本邦では多剤耐性アシネトバクター (Multi-Drug Resistant *Acinetobacter*: MDRA) と呼ばれる²⁾。本菌は、国内の医療施設においてアウトブレイクが散見されており、これまでに2008年福岡県、2009年東京都、2010年愛知県において発生事例が報告されている³⁾。本菌による感染症「薬剤耐性アシネトバクター感染症」は感染症法において2014年以降に5類全数報告疾患に指定されてい

¹⁾ 文京学院大学大学院保健医療科学研究科
〒113-0023 東京都文京区向丘2-4-1

連絡先：遠藤 優太
文京学院大学大学院保健医療科学研究科
Tel: +81-3-3811-0441
E-mail: y.endo01997@gmail.com

¹⁾ Graduate School of Health Care Science, Bunkyo Gakuin University, 4-1, Mukogaoka 2-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0023, Japan

受付日：2021年10月15日
採択日：2021年12月23日

る。薬剤耐性アシネトバクター感染症の報告数の推移は全数報告疾患に指定された2014年以降減少傾向であったが、2019年の報告数は前年と同数であった⁴⁾。 *A. baumannii*における薬剤耐性機構として、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変化、細菌細胞外への薬剤の能動的排出がある³⁾。この中でも近年注目されているのが、薬剤の能動的排出である。これはエフラックスポンプ (efflux pump) と呼ばれ、その耐性機序は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ことによる。このefflux pumpは、大きく分けて5タイプのファミリーに分類されている。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駆動力とするMATE型。③プロトン駆動型のMF型。④4回貫通型構造であるSMR型。⑤内膜貫通ユニット、外膜貫通ユニット、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タイプに分類される⁵⁻⁶⁾。これらefflux pumpはすべての細菌に元来保有しているものであり、各細菌においてそれぞれ数種類のファミリーを有していることがわかっている⁵⁾。これらのファミリーのうち、*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のがRND型である⁶⁾。RND型の主要なファミリーとして *adeABC*、*adeFGH*、*adeIJK*ファミリーが報告されている⁶⁾。しかし、日本国内において *A. baumannii*の臨床分離株を用いたefflux pumpに関する報告は、私が知る限りほとんど行われていない。そこで、本研究では国内（関東地方）における耐性傾向のある臨床分離株21株を用いてefflux pumpによる薬剤耐性化がみとめられるのかどうか調べた。

II. 方法と材料

1. 使用薬剤

カルバペネム系薬剤のイミペネム (Imipenem: IPM, LKT Laboratories)、メロペネム (Meropenem: MEPM、富士フィルム 和光純薬株式会社)、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)、アミノグリコシド系薬剤のアミカシン (Amikacin: AMK、富士フィルム 和光純薬株式会社)、ポリペプチド系薬剤のコリスチン (Colistin: CL、富士フィルム 和光純薬株式会社)、テトラサイクリン系薬剤のチゲサイクリン (Tigecycline: TGC、東京化成工業株式会社)、計7薬剤を使用した。

2. 使用菌株

*A. baumannii*標準株ATCC19606、緑膿菌標準株ATCC27853、大腸菌標準株ATCC2522、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。臨床分離株の *A. baumannii*の同定には *recA* 遺伝子を用いた簡易同定にて実施した⁷⁾。同定の際、*A. baumannii* ATCC19606を陽性コントロールとして使用した。

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⁸⁾。0.6-128 $\mu\text{g/mL}$ の濃度勾配になるように薬剤のプレートを作成した。CL、TGCは0.015-32 $\mu\text{g/mL}$ のプレートを作成した。その後、37 $^{\circ}\text{C}$ 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 (Susceptible; S)、中間 (Intermediate; I)、耐性 (Resistant; R) の判定をした⁸⁾。TGCに関しては判定基準が定められていないため、結果のみを示す。

4. efflux pump阻害剤 (EPI) による効果の判定

efflux pumpと薬剤耐性の関連を確認するため、efflux pump阻害剤であるCarbonyl Cyanide *m*-Chlorophenylhydrazone (CCCP、コスモ・バイオ株式会社) を使用した。CCCPを微量液体希釈法のMIC測定の際に終濃度1 mg/mL になるよう加え、阻害剤添加群においてMICが2管差以上低下した場合に、efflux pumpの関与を認めたと判定した⁹⁾。抗菌薬感受性試験の結果より耐性株の認められた3系統の薬剤のうちIPM、CPFEX、AMKの3薬剤を選択した。

5. PCRによる耐性遺伝子の確認

efflux pump関連遺伝子の有無を調べるため、遺伝子解析を行った。DNA抽出はボイル法で用い、TE buffer 150 μL に菌を懸濁し、100 $^{\circ}\text{C}$ ・10分加熱後、13000 rpm・5分・4 $^{\circ}\text{C}$ の条件で遠心した上清をtemplate (核酸濃度: 30-50 $\text{ng}/\mu\text{L}$)

とし、*adeB* (F: GCTACCTTCAGATGCAACCG、R: TAGATGCAGAGCTAGTCCGC)・*adeJ* (F: ATTGCACCACCAACCGTAAC、R: TAGCTGGATCAAGCCAGATA) プライマーを用いて、熱変性:94℃・30秒、アニーリング:*adeB* (60℃)・*adeJ* (56℃)・30秒、伸長反応:72℃・1分を35サイクル、初期熱変性:94℃・3分、最終伸長:72℃・6分の反応条件で行った。その後、2%アガロースゲルを用いて電気泳動(100V、35分)を行い、エチジウムブロマイドで15分染色後、UV照射 (benctop 2UV™ Transilluminator、ビーエム機器株式会社)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。

Ⅲ. 結果

1. 抗菌薬感受性試験

臨床分離株*A. baumannii* 21株の抗菌薬感受性試験の結果を (Table 1) に示した。CLSIによる判定で3薬剤耐性株は20株認められた。一方、厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業による判定でMDRAと判定された株は、7株認められた。カルバペネム系薬剤のIPM、MEPMでは全ての株に耐性を示したが、DRPMでは感性となる株が確認できた。フルオロキノロン系、アミノグリコシド系ではほぼ全ての株において耐性を示し、MIC₅₀、MIC₉₀ともに高い結果となった。CLにおいて耐性は認められなかった。比較的新規薬剤であるDRPMとTGCにおいては

すべての株において感性が認められた。TGCは判定基準が定められていないため既報と比較した。

2. efflux pumpの効果測定

efflux pumpの効果測定した結果を (Table 2) に示した。CCCPを添加した時、MICが変化していない場合0、1管差低下した場合は-1、2管差以上低下した場合は \leq -2と表記した。3薬剤のうち、CPFXに添加した組み合わせにおいて最も多くの株 (n=13) にefflux pumpの関与が示唆された。

3. 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*・*adeJ*は*A. baumannii* 21株すべてにおいて検出が確認された。

Ⅳ. 考察

*A. baumannii*の多剤耐性化に様々な耐性機構が知られており、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変化、細菌細胞外への薬剤の能動的排出が挙げられる。薬剤の能動的排出による耐性化は多くの株で確認されていることから、この耐性機構の解析は新規治療薬の開発において重要である。薬剤の能動的排出による耐性化には今回我々の研究では、薬剤排出機構であるefflux pumpに焦点を当て、抗菌薬感受性試験とefflux pumpの関与を調査した。抗菌薬感受性試験の結果から2015年3月に再承認の得られたCL¹⁰⁾において耐性株は確認されなかった。TGCはブレイクポイント定

Table 1 Antimicrobial susceptibility tests by the method of the Clinical and Laboratory Standards Institute.

	MICs (μ g/mL)			Susceptibility profile (n=21)		
	Range	MIC50	MIC90	S	I	R
IPM	8 - 32	8	16	—	—	21
MEPM	8 - 32	16	16	—	—	21
DRPM	0.125 - 16	4	8	6	4	11
CPFX	64 - >128	128	>128	—	—	21
LVFX	4 - 64	16	16	—	2	19
AMK	4 - 128	128	128	1	—	20
CL	0.125 - 0.5	0.25	0.5	21	—	—
TGC	2 - 8	4	8	—	—	—

Minimum inhibitory concentration (MICs). IPM: Imipenem, MEPM: Meropenem, DRPM: Doripenem, CPFX: Ciprofloxacin, LVFX: Levofloxacin, AMK: Amikacin, CL: Colistin, TGC: Tigecycline

Table 2 Evaluation of Efflux pumps.

	Evaluation of Efflux pumps (n=21)			total
	0	-1	≤-2	
IPM	10	9	2	21
CPFX	2	6	13	21
AMK	21	—	—	21

When the MIC to which CCCP was added did not change compared to the MIC, it was written as 0, when it decreased by 1 tube difference, it was described as -1, and when it decreased by 2 tube differences or more, it was expressed as ≤-2.

義機関であるCLSIならびにEuropean Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) による判定基準は現在のところ定められていない。国内の既報¹¹⁻¹²⁾によると*Acinetobacter*属IPM耐性株のMIC rangeは0.25-4 μg/mLであった。既報では*Acinetobacter*属の報告であるため単純比較はできないが、この値を参考にすると今回用いた耐性傾向のみられる*A. baumannii*においてもMIC rangeを大幅に超える株は確認されなかったため、CLおよびTGCは治療薬として有用であると推察される。しかし、*A. baumannii*の抗菌薬耐性を獲得しやすい特徴を踏まえると今後も継時的なサーベイランスが必要である。efflux pumpの効果測定では、IPM、CPFXにおいてエフラックスポンプの関与を認めた。特にCPFXにefflux pump阻害剤を添加した組み合わせにおいて最も多く効果が認められた (n=13)。今回使用した*adeB*は*adeABC*ファミリー、*adeJ*は*adeIJK*ファミリーの一部である。どちらもRND型efflux pumpに属しており、既報においても高い陽性率が報告されていたことから¹⁴⁾、今回の結果は既報と一致したといえる。PCR法では阻害剤添加で効果が認められなかった株においてもefflux pump関連遺伝子が検出された。この要因として、efflux pumpによる耐性化に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から¹⁴⁻¹⁵⁾、efflux pump関連遺伝子が陽性であっても発現量が少なかったために阻害剤による効果が表れなかったと考えられる。本研究の結果より今回使用した国内の*A. baumannii*ではefflux pumpにより耐性化が引き起こされていること、特にCPFXにおいて顕著であることが明らかとなった。この結果は耐性機構の解析を進める上での基礎的基盤となったと考えられる。さらに、efflux pump関連遺伝子の過剰発現

を定量することを目的にリアルタイムPCRを用いた遺伝子発現量の測定が今後の課題とされる。

V. 結語

今回我々は、*A. baumannii*の薬剤排出機構による耐性化についてefflux pump阻害剤を用いて測定し、PCRにて関連遺伝子の探索を行った。阻害剤を添加した場合、CPFXにて最も効果が認め、次いでIPMにおいて効果が確認された。従って本研究は*A. baumannii*の薬剤排出機構による耐性化の解析を行う上での基礎的基盤となったといえる。

本論文内容に関連する著者らの利益相反：なし

文献

- 1) 国立感染症研究所: 薬剤耐性アシネトバクター感染症. 病原微生物検出情報月報, 42 (3) : 49-50, 2021.
- 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-kansenshou11/01-05-140912-4.html> (2021年10月4日アクセス))
- 3) 上地幸平、切替照雄、藤田次郎、前田士郎: *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. 臨床微生物学会雑誌, 28 (2) : 83-97, 2018.
- 4) 国立感染症研究所: 感染症法に基づく薬剤耐性アシネトバクター感染症の届出状況. (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/mdra-m/mdra-idwrs/10322-mdra-210423.html> (2021年10月4日アクセス))
- 5) 西野邦彦: 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, 58 (4) : 443-452, 2018.
- 6) Xu C, Bilya SR, and Xu W: *adeABC* efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. New Microbe and New In-

- fect, 30: 100549, 2019.
- 7) 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> (2021年10月4日アクセス))
 - 8) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-eight Informational Supplement. 28: 42-44, 2018.
 - 9) Ni W, Li Y, Guan J: Effects of Efflux Pump Inhibitors on Colistin Resistance in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 60 (5) : 3215-3218, 2016.
 - 10) 二木芳人、館田一博、中嶋一彦、藤村茂、堀誠治、三嶋廣繁、柳原克紀、山岸由佳、吉田耕一郎、元山英勝: コリスチンの適正使用に関する指針 2015. *日本化学療法学会雑誌*, 63 (3) : 289-329, 2015.
 - 11) Javed H, Saleem S, Zafar A: Emergence of plasmid-mediated *mcr* genes from Gram-negative bacteria at the human-animal interface. *Gut Pathogens*, 12: 54, 2020.
 - 12) ファイザー株式会社: タイガシル点滴静注用50mg. (<chrome-extension://efaidnbnmnibpcjpcjglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fpins.japic.or.jp%2Fpdf%2FnewPINS%2F00060783.pdf&clen=525795&chunk=true> (2021年10月4日アクセス))
 - 13) 三嶋廣繁、藤村茂、渡辺晋一: チゲサイクリン適正使用のための手引き 2014. *日本化学療法学会雑誌*, 62 (3) : 311-366, 2014.
 - 14) 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.
 - 15) Moubareck CA, and Halat DH: Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. *MDPI*, 9: 119, 2020.