

—動物用抗菌性物質を取り巻く現状 (Ⅳ)—

薬 剤 耐 性 機 構

小澤真名緒[†] (農林水産省動物医薬品検査所検査第二部安全性検査第一領域主任研究官)

1 はじめに

抗菌性物質は、感染症の治療において人医療、獣医療のいずれにおいても重要な役割を果たしている。しかし、その使用により、薬剤耐性菌が選択される可能性が常に存在する。家畜由来薬剤耐性菌は、獣医療における抗菌性物質の有効性の低下により大きな問題となる。わが国においても、家畜由来株でセファロスポリン耐性やフルオロキノロン耐性をはじめさまざまな耐性が報告されているが、これらの耐性菌による感染症に適切に対処するためには、それぞれの菌の特徴や疫学だけでなく、耐性機構や耐性選択機構も考慮する必要がある。

2 耐性の獲得

細菌が薬剤耐性を獲得する機構として、突然変異または耐性因子の獲得が考えられる(図1)。前者は、細菌が増殖する過程で遺伝子が突然変異することにより耐性となるものである。たとえば、DNA ジャイレースの変異によるキノロン耐性や23S rRNAの変異によるマクロライド耐性がこれに該当する。一方、後者は、感受性

菌が自然界に存在する抗生物質産生菌や、すでに耐性因子を獲得した耐性菌から、プラスミド、トランスポゾン、インテグロン等を通じて耐性因子を獲得することにより耐性となるものである。たとえば、β-ラクタマーゼ遺伝子の獲得によるセファロスポリン耐性や tet 遺伝子の獲得によるテトラサイクリン耐性等がこれに該当する。

耐性を獲得した菌に、抗菌剤の使用という選択圧がかかると、感受性菌は死滅し耐性菌が選択される。薬剤耐性菌は、一般的には感受性菌と比較して適応性(増殖性や宿主での定着性)が低下するとされている[1]。したがって、抗菌剤による選択圧がなくなると、感受性菌が優勢となり、耐性菌は淘汰されてしまう。しかし、選択圧がかかり続けると、逆に感受性菌が淘汰され、耐性菌が選択され優勢となる。なお、耐性を獲得しても適応性が減少しないまたは増加するという例も報告されており[2]、その場合は選択圧がなくなっても耐性菌が淘汰されないと考えられる。

3 耐性機構

耐性機構は、おもに①抗菌剤の不活化、②作用点の変

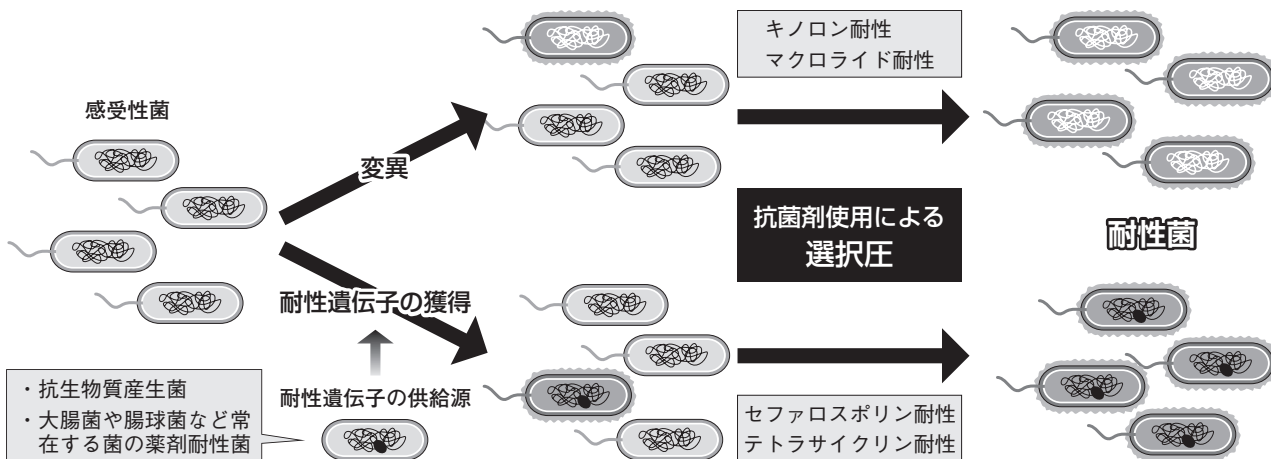


図1 耐性の獲得と抗菌剤使用による耐性菌の選択

[†] 連絡責任者: 小澤真名緒 (農林水産省動物医薬品検査所検査第二部安全性検査第一領域)

〒185-8511 国分寺市戸倉1-15-1

☎042-321-1841 FAX 042-321-1769

E-mail: manao_ozawa500@maff.go.jp

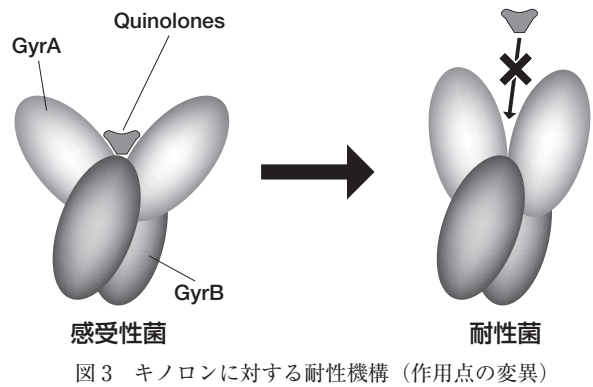
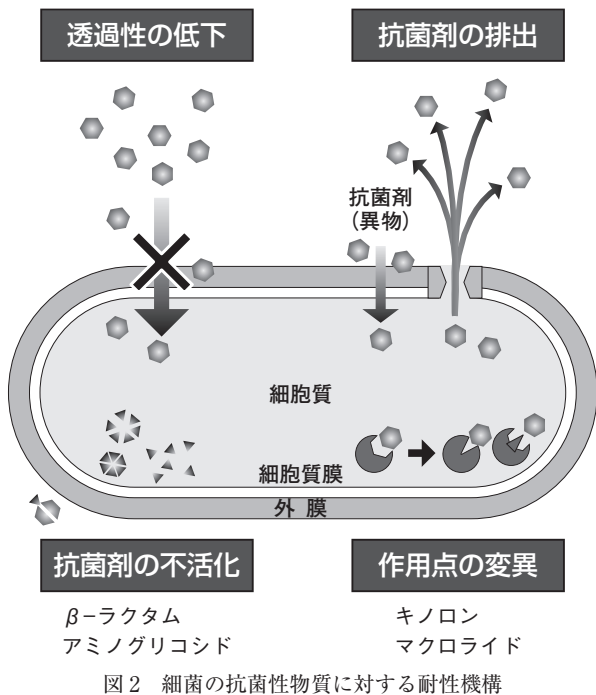


表 作用点の変化例

抗菌剤	作用点の変化例
β -ラクタム系	ペニシリン結合タンパク質 (PBP) の変化
マクロライド系	23S rRNA の変化
アミノグリコシド系	16S rRNA のメチル化
キノロン系	DNA ジャイレーズ及びトポイソメラーゼIVの変化
コリスチン	外膜リポ多糖 (LPS) の修飾

異, ③抗菌剤の排出, ④透過性の低下の4種類に分けられる (図2)。

(1) 抗菌剤の不活化

①不活化酵素による分解

β -ラクタマーゼ産生による β -ラクタム系耐性は, この酵素が加水分解によってこれらの抗生物質の β -ラクタム環を開裂することによる。 β -ラクタマーゼにはさまざまな種類があるが, 近年, 広範囲の β -ラクタム系抗生物質を分解できるように進化した基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) を産生する耐性菌が問題となっている。

②薬剤の修飾

アミノグリコシド系抗生物質の特定のアミノ基やヒドロキシル基は, 種々のアセチルトランスフェラーゼ (AAC), フォスフォトランスフェラーゼ (APH) 及びアデニルトランスフェラーゼ (AAD) による修飾によって不活化される [3]。また, クロラムフェニコールも, AACによって不活化される。

(2) 作用点の変化

一次作用点である酵素, リボソームなどの構造が変化し, 抗菌剤との結合が阻害または低下すると, 抗菌剤は十分に機能を発揮できなくなることから, 細菌は薬剤耐性となる (表)。

β -ラクタム系抗生物質耐性菌ではペニシリン結合タンパク質 (PBP) の変化により, マクロライド系抗生物質耐性菌では23S rRNAの変化により薬剤耐性となる。また, アミノグリコシド系抗生物質では, 16S rRNAメ

チルトランスフェラーゼ (16S-RMTase) によって16S rRNAがメチル化されると薬剤耐性となる [4]。

キノロン系合成抗菌剤耐性菌では, DNAの複製に関与する酵素であるDNAジャイレーズ及びトポイソメラーゼIVの変異により薬剤耐性となる。DNAジャイレーズはサブユニットA (GyrA) 2分子とサブユニットB (GyrB) 2分子からなる (図3)。DNAジャイレーズ及びトポイソメラーゼIV変異株はキノロンに耐性を示すことが各種細菌で報告されているが, その変異部位は大腸菌ではGyrAタンパクのN末端から67~106番目までの比較的狭い領域に局在している。この領域はキノロン耐性決定領域と呼ばれており, この近辺におけるアミノ酸の変異によって荷電や局所構造が変化し, 標的酵素とキノロンの親和性が低下した結果, キノロンに対して耐性化すると考えられている [5] (図3)。

コリスチンに対する耐性メカニズムは, コリスチンの作用点である細菌の外膜の変異が重要である。特に外膜の構成成分であるリポ多糖 (LPS) の構造の修飾による陰性荷電の減少がコリスチン耐性に関与している [6]。近年発見されたプラスミド性コリスチン耐性因子の *mcr-1* の耐性機構も, このLPSの構造の修飾によるものと考えられている [7]。

(3) 抗菌剤の排出

細菌は, 細胞内に取り込まれた抗菌剤を能動的に効率よく排出することにより, 細胞内の薬剤濃度を低下させることで薬剤耐性を示す機構を持っている (薬剤排出ポンプ)。大腸菌では, RND型と呼ばれる細菌の細胞内膜

から外膜の外までを橋渡しする形の薬剤排出システムが多剤耐性に関与している [8]。緑膿菌では大腸菌と同じ RND 型の排出システムが抗菌剤の排出に関与しているが [9]、これは大腸菌の排出システムとの相同性が高い。薬剤排出ポンプによる薬剤耐性の重要な点は、1つのシステムの活性化により、複数の抗菌剤耐性が付与されてしまう点である。

ある抗菌剤に特異的な薬剤排出の例としては、テトラサイクリン耐性遺伝子がある。テトラサイクリン耐性遺伝子には多数の種類があるが、多くの遺伝子はテトラサイクリンを排出する膜関連タンパクをコードしている。多くのこの排出タンパクはテトラサイクリン耐性を付与するが、ミノサイクリン耐性は付与しない。しかし、グラム陰性菌の *tet(B)* 遺伝子は、テトラサイクリンとミノサイクリンの両方の耐性を付与する [10]。

(4) 透過性の低下

抗菌剤が作用点に到達して効力を発揮するためには、細胞膜を通過する必要がある。疎水性の高い抗菌剤ほど細菌の細胞膜を通過しやすい。大腸菌の細胞壁の外膜には、菌体内に物質が通過するための通過孔であるポーリンがある。ポーリンを形成する主要なタンパク質の発現の低下によるポーリンの数の減少や、孔が狭まるような構造変化が起こると、抗菌剤の通過は困難になり細菌は耐性化する [11]。

(5) その他の耐性機構

① 誘導

誘導による耐性化とは、細菌が耐性遺伝子を保有しているが、その発現が抑制されており、基質としての抗菌剤があると調節遺伝子の転写翻訳が始まるというものである。たとえばマクロライド系抗生物質耐性の場合、普段は耐性遺伝子の転写物である mRNA が翻訳されないが、マクロライドがあるとその mRNA に結合して構造を変え、翻訳ができるようになる。14員環マクロライドに耐性で、16員環マクロライドには感受性の場合があるが、これは16員環マクロライドには誘導能がないためである [12]。

② 作用点の保護

伝達性のキノロン耐性因子である Qnr はプラスミド上に存在する [13]。Qnr によるキノロン耐性機構は、DNA ジャイレースとトポイソメラーゼ IV に直接結合することによって、これらの酵素がキノロンの作用を受けにくくなり、感受性が低下すると考えられている。

テトラサイクリン耐性遺伝子である *tet(M)*、*tet(O)* 等は、テトラサイクリンの作用からリボソームを保護する細胞質タンパクをコードしており、これらの働きによってテトラサイクリン耐性となる [10]。

③ 修飾酵素の変化

AAC(6')-Ib は、アミノグリコシド系抗生物質を修飾して不活化するアセチルトランスフェラーゼの一つである。この AAC(6')-Ib のアミノ酸が2カ所変異した AAC-(6')-Ib-cr は、アミノグリコシドだけではなく、フルオロキノロンであるシプロフロキサシンに対しても修飾作用を示すことが報告されている [14]。この *aac(6')-Ib-cr* 遺伝子はプラスミド上にあり、伝達性のキノロン耐性因子として知られている。

4 耐性選択機構

(1) MSW (Mutant Selection Window)

細菌の耐性選択機構として、MSW (耐性選択域) という考え方が提唱されている [15]。最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) では、通常の細菌は発育が抑えられるが、何らかの変異等によって耐性化した細菌は発育してしまう。耐性化した細菌もまったく発育できなくなる濃度を突然変異株阻止濃度 (Mutant Prevention Concentration : MPC) という。この MIC と MPC の間の濃度域では、感受性菌は発育できないが、耐性菌は発育できるため、耐性菌が選択されやすいとされており、これを MSW という。耐性菌の選択を防ぐためには、抗菌剤の作用部位において MPC 以上の濃度を保つ必要がある。

(2) 抗菌剤の使用による選択

抗菌剤の使用による耐性の選択は、直接選択、交差選択 (交差耐性による選択)、共選択 (共耐性による選択) の3種類に分けられる。直接選択とは、使用した抗菌剤によるその抗菌剤の耐性の選択である。交差選択とは、使用した抗菌剤により、その抗菌剤と同系統の抗菌剤の耐性を選択するものである。また、共選択とは、使用した抗菌剤により、その抗菌剤とは異なる系統の抗菌剤の耐性を選択するものであり、以下はその事例である。

わが国における動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM) において収集された健康豚由来大腸菌について、採材された個体における抗菌剤の使用歴と、その個体から分離された株の耐性の関係を統計的に解析した結果、β-ラクタム系の使用とジヒドロストレプトマイシン耐性、コリスチンの使用とカナマイシン耐性、マクロライド系の使用とアンピシリン耐性及びオキシテトラサイクリン耐性、テトラサイクリン系の使用とクロラムフェニコール耐性に有意な関係が認められた (図4) [16]。通常、大腸菌はマクロライド系に自然耐性を示すが、高度耐性株の中にはマクロライド耐性遺伝子を保有するものがあり、そのマクロライド耐性遺伝子と同じプラスミドにアンピシリン耐性遺伝子とテトラサイクリン耐性遺伝子が乗っている報告があることから [17]、

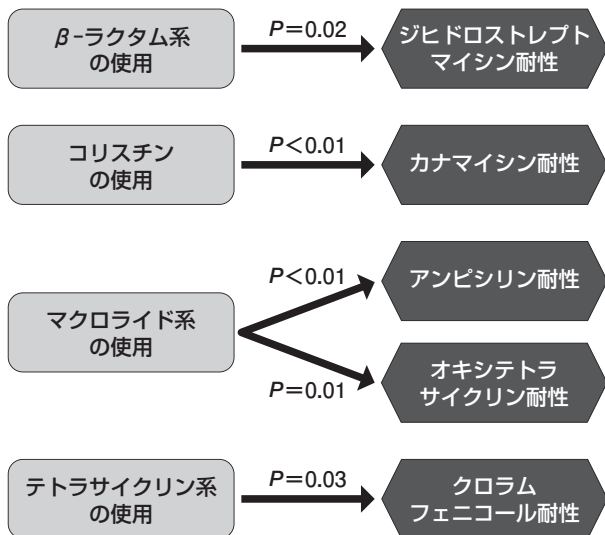


図4 豚由来大腸菌における抗菌剤使用と耐性の解析 (共選択) [16]

→: 抗菌剤の使用による耐性の選択 ($P<0.05$)

マクロライド系の使用によりマクロライド耐性遺伝子が選択された結果、アンピシリン耐性遺伝子またはテトラサイクリン耐性遺伝子が同時に選択された共選択の可能性が考えられる。また、コリスチンの使用とカナマイシン耐性に関係が認められている。図4に示した解析に用いた株では *mcr-1* の保有については不明だが、ベトナムの豚由来大腸菌が、*mcr-1* とカナマイシン耐性遺伝子が乗ったプラスミドを持っているという報告があり [18]、このプラスミドがコリスチンの使用によるカナマイシン耐性の共選択に関与している可能性がある。

5 おわりに

抗菌剤の使用と耐性菌の出現は「いたちごっこ」といわれるように、新しい抗菌剤ができては細菌はそれに対応して新たな耐性機構をつくりだす。また、プラスミド性のコリスチン耐性因子 *mcr-1* のように、これまで想定されていなかった耐性機構がすでに存在し、それが新たに発見されることもある。抗菌剤の使用による選択圧がかかると耐性菌が選択されやすくなるが、その場合、同系統の抗菌剤だけではなく、他系統の抗菌剤による共選択も考慮する必要がある。このような耐性機構や耐性選択機構を十分に理解したうえで、耐性菌の選択を最小限に抑える慎重な使用をすることが、耐性を獲得した菌のまん延を防ぎ、今後も抗菌剤の有効性を維持するうえで重要である。

引用文献

[1] Andersson DI, Levin BR : The biological cost of antibiotic resistance, *Curr Opin Microbiol*, 2, 489-493 (1999)
 [2] Andersson DI, Hughes D : Antibiotic resistance and

its cost: is it possible to reverse resistance?, *Nat Rev Microbiol*, 8, 260-271 (2010)

[3] Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM : Aminoglycosides: activity and resistance, *Antimicrob Agents Chemother*, 43, 727-737 (1999)
 [4] Doi Y, Arakawa Y : 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides, *Clin Infect Dis*, 45, 88-94 (2007)
 [5] Barnard FM, Maxwell A : Interaction between DNA gyrase and quinolones: effects of alanine mutations at GyrA subunit residues Ser (83) and Asp (87), *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 1994-2000 (2001)
 [6] Olaitan AO, Morand S, Rolain JM : Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria, *Front Microbiol*, 5, 643 (2014)
 [7] Pham Thanh D, Thanh Tuyen H, Nguyen Thi Nguyen T, Chung The H, Wick RR, Thwaites GE, Baker S, Holt KE : Inducible colistin resistance via a disrupted plasmid-borne *mcr-1* gene in a 2008 Vietnamese *Shigella sonnei* isolate, *J Antimicrob Chemother*, 71, 2314-2317 (2016)
 [8] Okusu H, Ma D, Nikaido H : AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants, *J Bacteriol*, 178, 306-308 (1996)
 [9] Gotoh N, Tsujimoto H, Poole K, Yamagishi J, Nishino T : The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by *oprK* of the *mexA-mexB-oprK* multidrug resistance operon, *Antimicrob Agents Chemother*, 39, 2567-2569 (1995)
 [10] Chopra I, Roberts M : Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance, *Microbiol Mol Biol Rev*, 65, 232-260 (2001)
 [11] Mortimer PG, Piddock LJ : The accumulation of five antibacterial agents in porin-deficient mutants of *Escherichia coli*, *J Antimicrob Chemother*, 32, 195-213 (1993)
 [12] Leclercq R, Courvalin P : Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification, *Antimicrob Agents Chemother*, 35, 1267-1272 (1991)
 [13] Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC : The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance, *Lancet Infect Dis*, 6, 629-640 (2006)
 [14] Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC : Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase, *Nat Med*, 12, 83-88 (2006)
 [15] Drlica K : The mutant selection window and antimicrobial resistance, *J Antimicrob Chemother*, 52, 11-17 (2003)
 [16] Makita K, Goto M, Ozawa M, Kawanishi M, Koike R, Asai T, Tamura Y : Multivariable analysis of the association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from apparently healthy pigs in Japan, *Microb Drug Resist*, 22, 28-

- 39 (2016)
- [17] Andremont A, Gerbaud G, Courvalin P : Plasmid-mediated high-level resistance to erythromycin in *Escherichia coli*, *Antimicrob Agents Chemother*, 29, 515-518 (1986)
- [18] Malhotra-Kumar S, Xavier BB, Das AJ, Lammens C, Hoang HT, Pham NT, Goossens H : Colistin-resistant *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* isolated from food animals in Hanoi, Vietnam, *Lancet Infect Dis*, 16, 286-287 (2016)
-