

主論文の要旨

**Risk factors for and role of OprD protein in increasing
minimal inhibitory concentrations of carbapenems in
clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa***

〔 緑膿菌の臨床分離株におけるカルバペネム系抗菌薬の
MIC 値の上昇に関する危険因子と OprD の役割 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
生体管理医学講座 臨床感染統御学分野

(指導：八木 哲也 教授)

平林 亜希

【緒言】

緑膿菌はしばしば重篤な感染症を引き起こし、また様々な抗菌薬への耐性を獲得することが知られている。カルバペネム系抗菌薬(CARBs)は広域抗菌薬で、緑膿菌感染症の治療薬の最後の手段として用いられる。しかし、近年世界中で CARBs に耐性化した緑膿菌について報告されており、その割合は 10-50%程度にも上る。緑膿菌の CARBs への耐性化の機序として主に、カルバペネマーゼの産生、抗菌薬を細胞内から外に排出する efflux ポンプの活性化、抗菌薬の細胞内への入り口となる膜タンパク OprD の欠損が関与することが報告されている。このうち緑膿菌の CARBs への耐性化は、OprD の欠損が主に関与するとされている。また、耐性の基準として CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2015)では MIC(最小発育阻止濃度)が $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ 、EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing) Version 5.0 では $>8 \mu\text{g/mL}$ と両者で異なるブレイクポイントが設定されている。両者で異なる基準を設定している MIC が $8 \mu\text{g/mL}$ 付近の株に臨床現場ではしばしば遭遇するが、その菌株での耐性機序や治療効果については議論の余地があると考えられる。本研究では、当院で検出された同一患者の検体から分離された緑膿菌において CARBs への耐性化の機序や臨床的危険因子を明らかにする。

【対象及び方法】

名古屋大学医学部附属病院で 2012 年 4 月から 2013 年 3 月までに検出された緑膿菌の臨床分離株のうち、同一患者から複数日に検出されたものを対象とした。17 種類の抗菌薬の MIC 値を MicroScan WalkAway system (NegCombo 3.12J)で測定し、4 倍以上上昇したものを耐性化と定義した。対象となる症例の既往歴や薬剤使用歴などの臨床情報を電子カルテから抽出した。CARBs に耐性化する危険因子については、SPSS version 22 を用いて多変量解析を行った。

同一患者で CARBs に耐性化した前後の緑膿菌株を PFGE 法を用いて分子疫学的背景を調べ、同一の遺伝子型を示した株について Carba NP 法、mCIM 法、PCR 法を用いてカルバペネマーゼの産生を調べた。また、TGX Stain-Free プレキャストゲルを用いた western blot 法による OprD の発現量の変化、sequence 法による *oprD* 遺伝子の解析を行った。さらに quantitative real-time PCR (qPCR)法を用いて *oprD* や efflux ポンプに関わる遺伝子の mRNA の発現の解析を行った。(プライマーは Table 1 を参照) コントロール株として PAO1 緑膿菌株を用い、実験は全て 3 回繰り返した。

【結果】

期間内に 266 症例、719 株の緑膿菌が検出され、このうち複数日に緑膿菌が検出された 106 症例、検出緑膿菌 532 株が本研究の対象となった (Fig. 1)。106 症例のうち 64 症例はいずれかの抗菌薬で MIC の 4 倍以上の上昇を認めた。このうち 27 症例 (group A) は CARBs への耐性化を、37 症例 (group B) は CARBs 以外の抗菌薬への耐性化を認めた。残りの 42 症例 (group C) はいずれの抗菌薬にも耐性化を示さなかった。緑膿菌の

CARBs への耐性化に関与する危険因子を多変量解析を用いて解析すると、CARBs に耐性化した群 (group A) ではそれ以外の群 (group B+C) と比較し、CARBs の使用歴 (OR, 2.799; 95% CI, 1.088–7.200; $p=0.033$) と人工呼吸器や気管切開の使用 (OR, 2.648; 95% CI, 1.051–6.671; $p=0.039$) に有意差を認めた (Table 2)。

同一患者から分離された耐性化前の株 (isolate X) と耐性化後の株 (isolate Y) について PFGE 法を行ったところ、19 症例の株が 85% 以上と高い相同性を持ち、同一の遺伝子型であると判断した (Fig. 2)。いずれの株も Carba NP 法、mCIM 法、PCR 法にてカルバペネマーゼの産生は否定的であった。

耐性化前後における OprD の発現量を western blot 法で比較したところ、Table 3 に示すように 2 つのグループに分けられた。19 症例中、12 症例は耐性化後のイミペネム (IPM) の MIC が $>8 \mu\text{g}/\text{mL}$ で subgroup A1 に、7 症例は MIC が 4 あるいは $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ で subgroup A2 に分けられた。subgroup A1 の耐性化後の株の OprD 蛋白量は PAO1 と比較すると平均値は 0.023 で耐性化前に比べて著減しているのに対し、subgroup A2 の平均値は 0.37 と耐性化前に比べて発現量は減少しているものの、subgroup A1 に比較して優位に ($p=0.002$) 高かった (Fig. 3)。この傾向はメロペネム (MEM) では見られなかった。

oprD 遺伝子とその周辺部の sequence 解析の結果、subgroup A1 の 12 株のうち 11 株が耐性化前の配列結果と比較して *oprD* 遺伝子に変異が認められた (Table 4)。このうち株 1Y の 1,212bp の挿入配列は ISPa9 と 99% の相同性を持ち、株 11Y の 347bp の挿入配列は既報にはない配列であった。subgroup A1 のうち残りの 1 株と subgroup A2 の全 7 株は *oprD* とその上流と下流の遺伝子に耐性化前後で変異は見られなかった。

oprD の mRNA の発現量は、subgroup A1 の 1 株では著減、subgroup A2 では 1 株 (株 18) を除いて減衰傾向を認め、western blot 法の結果と相関がみられた。

efflux ポンプについて qPCR にて発現量を調べたところ、2 株において *mexR*, *mexA*, *oprM* の発現量が高く、いずれも MEM の MIC が高かったが、*mexT*, *mexE*, *oprN* の発現量と IPM や MEM の耐性との関連は乏しかった。

【考察】

既報では *oprD* mRNA や OprD 蛋白の減衰について解析した例はあるが、臨床的に同一患者から検出された緑膿菌で CARBs への MIC の上昇について検討した報告はほとんどない。また、本研究では OprD 蛋白の発現量を TGX Stain-Free プレキャストゲルにて、より正確に測定することができた。その結果、IPM の MIC が $>8 \mu\text{g}/\text{mL}$ の株では OprD 蛋白の発現量が消失し、4 または $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ の株で減衰する傾向にあることが判明した。OprD の減衰は *mexEF-oprN* の発現と関連があるとの既報があるが、本研究ではこれらの関連はみられなかった。耐性化前後の株で *oprD* 遺伝子配列を調べたところ、IPM の MIC が $>8 \mu\text{g}/\text{mL}$ の株では塩基の欠損、変異、挿入により、フレームシフトやストップコドンがみられ、機能的な OprD 蛋白が作られなくなることが推測された。11Y 株の 347bp の繰り返し配列の挿入は既報にはなく、新規の配列パターンで

ある可能性がある。しかし、詳細な構造や機能については明らかにしていないため今後の研究が必要である。

MIC の上昇と OprD 蛋白の減少との関連は IPM では認められるものの MEM では見られなかった。MexAB-OprM の基質は IPM ではなく MEM であるが、この発現の上昇が MEM の耐性化に関与することが過去に報告されている。本研究でも、株 12Y と株 18Y に *mexR*、*mexA*、*oprM* の mRNA の上昇がみられ、MEM の MIC は他の株と比べて高かった。つまりこれらの株の MEM の耐性化は MexAB-OprM による排出システムの亢進による可能性が示唆された。

本研究の目的は、緑膿菌の臨床分離株の CARBs の MIC の上昇に関して解析することである。このため、基準の方法である微量液体希釈法などに比べ乖離が報告されているが、臨床で通常用いられる MicroScan WalkAway system による MIC の値を使用した。本研究結果からは、IMP の MIC が $>8 \mu\text{g/mL}$ と $8 \leq \mu\text{g/mL}$ とで耐性のメカニズムが異なることから、 $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ を耐性とする CLSI の基準よりも $>8 \mu\text{g/mL}$ を耐性とする EUCAST の基準をより支持する結果であった。

本研究の結果は臨床的な示唆を含む。Lister らによるとレボフロキサシンの MIC が $4 \mu\text{g/mL}$ 、IPM の MIC が $8 \mu\text{g/mL}$ のときは併用療法が奏功するが、IPM の MIC が $32 \mu\text{g/mL}$ の場合は併用療法が奏功しないと報告されている。その理由は、IPM の MIC が $8 \mu\text{g/mL}$ の株は OprD は減少しているものの発現されているので併用療法の効果が期待できるが、MIC が $32 \mu\text{g/mL}$ では *oprD* 遺伝子に変異し、機能する OprD が消失するため、併用療法が期待できないと考えられる。

多変量解析の結果、CARBs の耐性化の危険因子は、耐性化後の MIC が 4 や $8 \mu\text{g/mL}$ といった低いレベルの症例を含めても、既報と同じく CARBs の使用歴と人工呼吸器あるいは気管切開であった。このことは CARBs の適正使用の重要性を示すものである。本研究は一施設内の研究で数も少ないため、多施設でより多くの症例数での検討が必要である。

【結論】

本研究では、IPM の MIC $>8 \mu\text{g/mL}$ の株で機能的な OprD 蛋白の消失が、4 あるいは $8 \mu\text{g/mL}$ の株では OprD 蛋白の減衰が起こることがわかった。MIC 値 $8 \mu\text{g/mL}$ は IPM 耐性の緑膿菌による感染症の治療に関して重要なブレイクポイントになりうる。CARBs の使用を抑え、抗菌薬を適正に使用することが、緑膿菌の IPM への耐性化抑制には重要である。