

主論文の要旨

**Carbapenem-Nonsusceptible *Haemophilus influenzae*
with Penicillin-Binding Protein 3 Containing an
Amino Acid Insertion**

（アミノ酸挿入を含むペニシリン結合タンパク質3を持つ
カルバペネム非感性のヘモフィルス・インフルエンザ）

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
微生物・免疫学講座 分子病原細菌学分野

（指導：荒川 宜親 教授）

北岡 一樹

【緒言】

Haemophilus influenzae、特に莢膜血清型が b (serotype b) の株 (Hib) は、菌血症や髄膜炎、急性喉頭蓋炎を引き起こすことが多く、致死的な病原菌の一つとして知られている。Hib ワクチンの導入で Hib による侵襲性感染症は減少したが、莢膜血清型が nontypable の株による咽頭炎、気管支炎、中耳炎などはしばしば発生しており、*H. influenzae* は現在でも気道感染症や耳鼻科領域の感染症の主要な病原菌の一つである。元来、*H. influenzae* は β -ラクタマーゼを産生しないため、本菌による感染症の治療には β -ラクタム系抗菌薬が使われていたが、1980 年代以降、TEM-1 や ROB-1 などの β -ラクタマーゼ (ペニシリナーゼ) を産生する株が欧州で出現した。また、我が国を中心に β -ラクタマーゼを産生しないにもかかわらずアンピシリンに耐性を示す BLNAR (β -lactamase-negative, ampicillin-resistant *H. influenzae*) と命名された β -ラクタム系抗菌薬耐性株が出現し臨床的に問題となってきた。BLNAR の β -ラクタム系抗菌薬耐性の主たるメカニズムは、ペニシリン結合タンパク質 3 (PBP3) にアミノ酸置換が生じることである。ただし、これまでに、 β -ラクタム系抗菌薬の中で最も広い抗菌スペクトラムを持つカルバペネムに対して非感性 (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の推奨する薬剤感受性試験で S[感性]と判定されない) と判定される *H. influenzae* は国内外でほとんど報告がない。しかし、我々の研究室にはカルバペネム非感性と判定された *H. influenzae* の臨床分離株が保管されていたため、PBP3 をコードする *ftsI* 遺伝子の塩基配列等の解析を通じて、カルバペネム非感性株が獲得した新規メカニズムについて解析を実施した。

【対象及び方法】

我々の研究室が保有している臨床分離 *H. influenzae* の 157 株について、抗菌薬感受性試験を実施し、カルバペネムに対して低感受性株 (イミペネム、ピアペネムの MIC 値がそれぞれ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上) を選択した。それらの株について *ftsI* 遺伝子について塩基配列の解析を行い、カルバペネム非感性と判定され、V525_N526insM を含む PBP3 を持つ *H. influenzae* NUBL1772 株を見出した。

NUBL1772 株の *ftsI* 遺伝子を、エレクトロポレーション法により標準株である *H. influenzae* Rd に導入して、染色体上の *ftsI* 遺伝子と相同組換えを起こさせた変異株 (以下、遺伝子組換え株) を作製し、遺伝子組換え株の抗菌薬感受性試験を行った。加えて、NUBL1772 株の *ftsI* 遺伝子から V525_N526insM に相当する 3 塩基のみを欠失させた *ftsI* 遺伝子を保有する遺伝子組換え株、標準株の *ftsI* 遺伝子に V525_N526insM に相当する 3 塩基のみを挿入した *ftsI* 遺伝子を保有する遺伝子組換え株等を作成し実験を行った。

次に標準株と NUBL1772 株の *ftsI* 遺伝子をそれぞれベクター (pET-47b(+)) に導入し、大腸菌 (Rosetta2(DE3)pLysS) を宿主として PBP3 を発現させ、Histag を有する PBP3 をニッケルカラムを用いて精製した。蛍光ペニシリンとカルバペネムを用いて PBP3 への競合結合アッセイを行い、PBP3 のカルバペネムとの親和性を評価した。

NUBL1772株が示すカルバペネム非感性に関する他のメカニズムを探索するために、薬剤排出ポンプの一つである AcrAB の遺伝子 (*acrAB*) の転写を負に調節 (抑制) する *acrR* 遺伝子の塩基配列を確認した。さらに、qRT-PCR を用いて NUBL1772 株の *acrB* 遺伝子の転写量を標準株と比較し、AcrAB によって効率的に排出される ethidium bromide (EB) の細胞内集積の初速を NUBL1772 株と標準株とで比較することにより、AcrB の発現を評価した。

【結果】

☆*H. influenzae* NUBL1772 株の抗菌薬感受性と *ftsI* 遺伝子の塩基配列解析結果 (TABLE 1、FIG 1) :

CLSI の定めるブレイクポイントに基づき、NUBL1772 株に対するカルバペネム系薬であるメロペネム、イミペネム、ドリペネムの最小発育阻止濃度 (MIC) は「非感性」の範疇と判定された。NUBL1772 株の *ftsI* 遺伝子の塩基配列から推定される PBP3 のアミノ酸配列には、標準株と比較し、多数のアミノ酸置換に加えて、526 番目にメチオニンが挿入されていた。

☆NUBL1772 株関連の *ftsI* 遺伝子組換え株の抗菌薬感受性 (TABLE 2) :

NUBL1772 株の *ftsI* 遺伝子全体を持つ遺伝子組換え株に対するカルバペネムの MIC は、標準株に対するそれと比べて上昇したが、NUBL1772 株に対する MIC のレベルには達しなかった。NUBL1772 株の *ftsI* 遺伝子から V525_N526insM に相当する 3 塩基のみを欠失させた *ftsI* 遺伝子を保有する遺伝子組換え株に対するカルバペネムの MIC は、NUBL1772 株に対するそれと比べて低下した。しかし、標準株の *ftsI* 遺伝子に V525_N526insM に相当する 3 塩基のみを挿入した *ftsI* 遺伝子を保有する遺伝子組換え株に対するカルバペネムの MIC は、標準株に対するそれと変わらなかった。

☆NUBL1772 株の PBP3 のカルバペネムとの親和性 (TABLE 3) :

カルバペネムによる NUBL1772 株の PBP3 と蛍光ペニシリンの結合の 50% 阻害濃度 (IC₅₀) は、標準株に比べて有意に高かった。

☆NUBL1772 株の AcrR のカルバペネム低感受性への影響 (TABLE 4) :

塩基配列の解析により、NUBL1772 株の AcrR のアミノ酸配列は、途中からフレームシフトを起こしていることが確認され、転写の早期終結が予想された。実際に、AcrR により負に制御 (抑制) される *acrB* 遺伝子の NUBL1772 株における転写量は、標準株のそれと比べて有意に上昇していた。NUBL1772 株の EB 細胞内集積の初速は、標準株と比べて有意に低下しており、AcrR の機能低下により高産生された AcrAB による EB の排出量の増加の予測と矛盾しなかった。

【考察】

本研究によって、NUBL1772 株の *ftsI* 遺伝子全体を持つ遺伝子組換え株においてはカルバペネム感受性が低下し、さらに、NUBL1772 株に由来する PBP3 のカルバペネムへの親和性が低下していたことから、*H. influenzae* では V525_N526insM を含む変異

型 PBP3 の獲得がカルバペネム低感受性に関係していることが強く示唆された。これまで、V525_N526insM を含む PBP3 を持ちカルバペネム低感受性を示す *H. influenzae* 株の報告はある。しかし、カルバペネム低感受性の機構については着目や検討はされておらず、今回我々が実施したような遺伝子組換え株を用いた V525_N526insM を含む PBP3 とカルバペネム低感受性との関係性の解析や証明はされていなかった。NUBL1772 株の *ftsI* 遺伝子から V525_N526insM に相当する 3 塩基のみを欠失させた *ftsI* 遺伝子を保有する遺伝子組換え株のカルバペネムの感受性が、NUBL1772 株と比べて上昇したことから、V525_N526insM がカルバペネム低感受性に少なからず寄与していることが確認された。今回我々が実施した NUBL1772 株の PBP3 の computer modeling により、V525_N526insM は PBP3 の β 3-4 ループに存在し、 β 3-4 ループの構造の変化を引き起こすことが示唆された。*Streptococcus pneumoniae* の PBP1a, 2b において、 β 3-4 ループにアミノ酸置換を獲得することで β 3-4 ループの柔軟性が増大し、 β -ラクタム系抗菌薬の感受性が低下するという現象が報告されており、NUBL1772 株も同様に、PBP3 の β 3-4 ループの柔軟性の増大を通じてカルバペネムへの親和性が低下し、低感受性を獲得した可能性が考えられた。また、標準株の *ftsI* 遺伝子に V525_N526insM に相当する 3 塩基のみを挿入した *ftsI* 遺伝子を保有する遺伝子組換え株では、カルバペネム感受性は変化せず、この結果は、V525_N526insM は PBP3 内の他のアミノ酸置換と共存することで、カルバペネムへの感受性低下を引き起こすことが示唆された。

NUBL1772 株の *ftsI* 遺伝子全体を持つ遺伝子組換え株に対するカルバペネムの MIC は、NUBL1772 株より低く、NUBL1772 株は *acrB* 遺伝子の転写亢進に基づく排出量増強につながる、早期終結する不完全型 AcrR を持っていたことから、AcrR の機能欠落も NUBL1772 株におけるカルバペネム低感受性に関与していることが示唆された。

現在、カルバペネムは多くの細菌感染症例において、最終的な選択肢となる抗菌薬である。NUBL1772 株のような、V525_N526insM を含む PBP3 と薬剤排出ポンプの機能亢進とを獲得したカルバペネム非感性 *H. influenzae* の出現と拡散は、*H. influenzae* 感染症におけるカルバペネムによる治療困難の原因となる恐れがあり、今後の動向を監視していく必要がある。

【結論】

本研究では、*ftsI* 遺伝子の相同組換えと PBP3 とカルバペネムとの親和性の比較、および不完全な AcrR の制御下における AcrB の高発現状況の確認を通じて、*H. influenzae* における V525_N526insM を含む変異型 PBP3 の獲得と薬剤排出機構の機能増進とがカルバペネム低感受性に関与していることを初めて解明した。