

抗菌薬耐性グラム陰性菌の生き残り戦略と感染症治療薬の開発

石井 良和

Survival Strategies of Antibiotic-resistant Gram-negative Organisms and the Development of Future Treatment Option for Infectious Diseases

Yoshikazu ISHII

Department of Microbiology and Infectious Diseases, Toho University School of Medicine

(2019年8月1日受付・2019年9月18日受理)

要 旨

新たな抗菌薬が臨床で応用されると、必ずそれに対する耐性菌が出現してきた。しかし、耐性因子を保有する菌株は、感性菌と比較すると発育速度が遅いなどの生存に不利益な点がある。そのため耐性菌は医療施設などの特殊な環境のみで生存できるとされている。しかし、近年、市中感染の原因となる耐性グラム陰性菌が出現している。本稿では、耐性グラム陰性菌がどのようにして発育速度の不利を克服し、市中に拡散したかについて概説する。さらに、感染症治療薬開発の現状と今後の展望について私見を交えて議論する。

Key words : 抗菌薬, 耐性菌, グラム陰性菌, 生残

グラム陰性菌の主要な抗菌薬耐性機構

グラム陰性菌はグラム陽性菌に存在しない、外膜と呼ばれるリン脂質二重層からなる構造物を有している。この外膜が物質の菌体内への透過を制限している。水溶性で比較的分子量が小さいβラクタム系などの抗菌薬は、ポーリン孔と呼ばれる3分子のタンパク質で形成される外膜に埋め込まれた“孔”を介してペリプラスム空間に侵入する。細胞質膜には外膜のような厳しい透過制限機能がないので、ペリプラスム空間内の抗菌薬は標的部位に到達し、その作用を発揮する。

上述のような過程を経て効力を発揮する抗菌薬に対してグラム陰性菌は、以下のメカニズムで耐性を獲得する。すなわち、1) 菌体内の抗菌薬濃度制限、2) 標的部位の変化、3) 抗菌薬の不活化である。菌体内における抗菌薬濃度の低下をもたらす因子としては、透過孔の欠損と多剤排出ポンプの高発現がある。グラム陰性菌における抗菌薬の標的部位の変化による耐性化の例としては、キノロン系薬の標的酵素であるDNA複製にかかわる酵素の突然変異やリボソームのメチル化によるアミノ配糖体系薬耐性が挙げられる。抗菌薬の不活化による耐性の例

としてはアミノ配糖体系薬修飾酵素やβラクタム系薬の加水分解酵素の産生が挙げられる (Figure 1)。

自然界における耐性遺伝子プール

医療施設内では、シンクやそれにつながる配管設備に生息する環境菌が耐性遺伝子のリザーバーであり、これを介した院内感染の可能性を指摘する報告がある。また、病院外では抗菌薬が投与されている家畜やその飼育環境が耐性菌のリザーバーとなる可能性が指摘されている¹⁾。耐性遺伝子保有菌株による汚染を受けた病院のシンクからの排水は、污水处理施設で処理された後、自然界に放出される。また、家畜の糞尿は希釈されて自然界に拡散する²⁾。

耐性遺伝子保有菌株は、耐性因子を発現するために耐性因子非保有菌株と比較すると余分なエネルギーを要するため、増殖速度が遅く、自然界では淘汰されると考えられてきた。しかし近年、自然界に生息する非病原細菌が発現はしないものの耐性遺伝子を獲得した例や生存に不利益な増殖速度の低下を代償する遺伝子変異を獲得している耐性菌が臨床材料から分離されたことなどが報告されている^{3,4)}。

一方で、抗菌薬の選択圧が全くない様々な環境からも

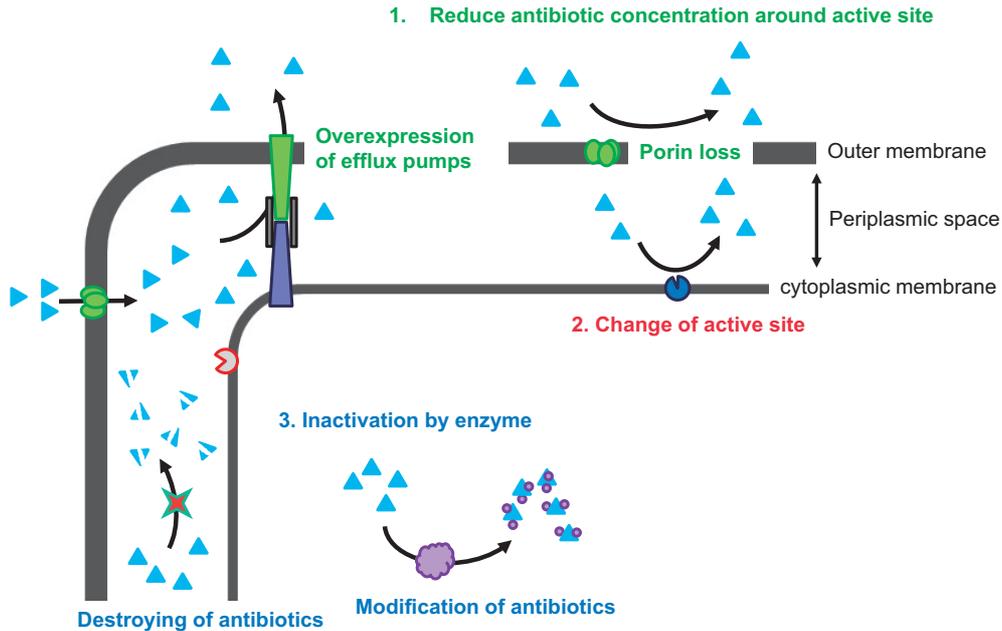


Figure 1 Antibiotic resistance mechanism in Gram-negative bacteria

耐性遺伝子は検出されている。例えば、400 万年以上孤立していたニューメキシコ州のレチュギラ洞窟やユコン州ドーソンシティ東部の 3 万年前の永久凍土堆積物からも耐性遺伝子が検出されている^{5,6)}。さらに、海洋からのクラス D に属するカルバペネマーゼをコードする遺伝子の検出や、クラス B に属するカルバペネマーゼをコードする遺伝子保有菌株の分離などの報告がある^{7,8)}。

抗生物質という言葉の古典的な定義は、“微生物が他の微生物の発育を阻止するために産生する物質”である。地球が誕生したのは 46 億年前、原始生命体は約 38 億年前、真核生物は 15 億年前、ヒトが誕生したのは約 600 万年であると推定されている。微生物は誕生して以降、長きに亘り、種を繁栄させるために他の微生物の発育を阻止する物質、すなわち抗生物質の産生をしてきたが、自らが産生した抗生物質で自身の発育が阻止されないように耐性因子も同時に保有するようになったと考えられる。その歴史を遡ると主要な β ラクタム系薬耐性因子の β ラクタマーゼは 20 億年以上前に誕生したと推定されている⁹⁾。太古の昔から、抗生物質生産菌が保有する耐性因子をコードする遺伝子が、自然界の耐性遺伝子のプールとなっていたと推察される。

生存に不利な耐性菌の生き残り戦略

先に述べた如く、多くの耐性菌の増殖速度は遅い。緑膿菌におけるキノロン耐性は主として *gyrA* のキノロン耐性決定領域 (QRDR) と呼ばれる部分の変異によって獲得される。*GyrA* は DNA の複製時に重要な超らせん構造の形成・弛緩を司る酵素であるが、*gyrA* の

QRDR に変異が生じた変異型 *GyrA* は超らせん構造形成能が低下し、増殖速度の低下が認められる。*gyrA* 変異を連続継代培養することにより、増殖速度が正常な変異株が出現するが、この菌株には超らせん構造形成・弛緩を正常レベルに回復させる代償的突然変異が認められることが報告されている¹⁰⁾。すなわち、生存に不利な耐性菌は、代償性遺伝子上に得た突然変異により、その不利益を回避できる場合があると考えられる。

市中における尿路感染症の原因菌である基質拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌は特定起源であることが知られている。この起源株とは、1960 年代から 1980 年代にかけて出現した可動性遺伝因子によって病原性および薬剤耐性遺伝子を獲得した菌株である。1990 年代から 2000 年代頃、この中から ESBL 遺伝子を搭載した IncF プラスミドを保有する病原性と耐性を兼ね備えた、いわゆる“成功”株が同時・多発的に出現したと考えられている。なお、この“成功”株は IncF プラスミドの保有に伴う不利益を相殺する代償性変異を染色体上に獲得したことが明らかにされているとなっている¹¹⁾。

耐性因子不要の細菌の生き残り戦略

臨床では感性を示す抗菌薬を投与しても感染症が治癒せず、感染局所から投与した抗菌薬に感性を示す菌株が分離されることがある。その原因としてバイオフィーム形成が挙げられる。ペニシリンやリゾチムを発見したフレミングが歯周や創部でバイオフィームを観察したことが知られている。バイオフィームはタンパクや核酸などの成分で形成され、内部は嫌気的環境である。バイオ

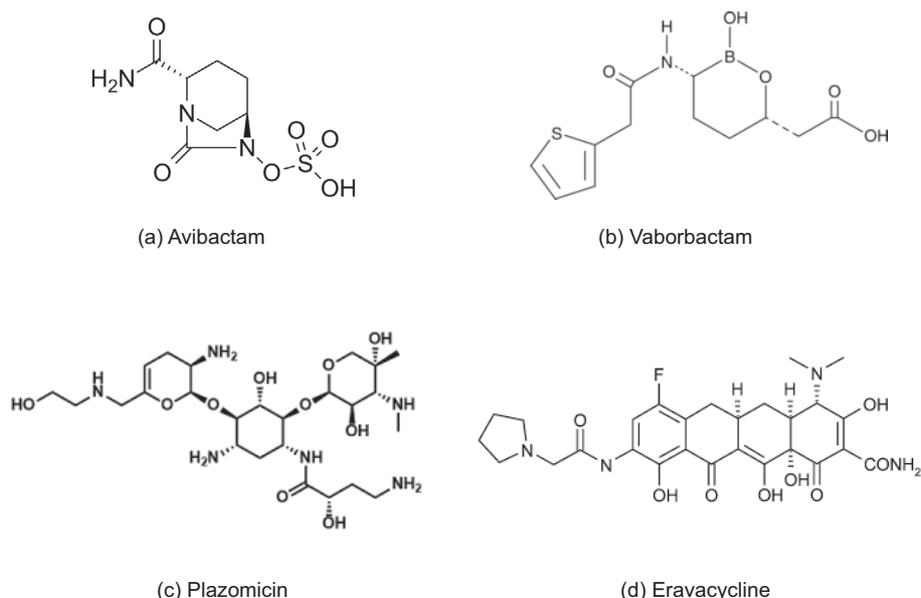


Figure 2 Chemical structures of novel antibiotics

フィルムは、生体内に留置される各種デバイスや逆流血によって障害された心臓弁膜の障害部などの生体に付着・定着した菌体が生成するマトリクスにより形成されるが、バイオフィルムの内部の細菌は長期にわたって生存する。また、バイオフィルム内部への抗菌薬の透過性は低く、またマクロファージや好中球などの免疫系から細菌を守る役割も果たしている。バイオフィルムの崩壊に伴ってその内部の細菌は浮遊菌として外部に放出され、新たな部位に定着して感染巣を形成する¹²⁾。

1944年 Bigger により黄色ブドウ球菌に高濃度のペニシリンを作用させても殺菌されない抵抗性菌 (persister) が存在することが報告され、培養液中に存在する増殖を停止している細菌にはペニシリンの効果がないことが明らかとなった¹³⁾。Persister は、浮遊菌の中に少数存在する。大腸菌の同一の細菌集団には抗菌薬に暴露する前から一定割合で persister が存在しており、新鮮培地に接種しなおすと一定の割合で persister が出現することが報告されている。集団中の一部が生残すれば一晩で1億倍に増殖できるという細菌の性質に基づく生き残り戦略であろう。

抗菌薬パイプライン

急性疾患である感染症の治療に用いられる抗菌薬は、慢性疾患用の薬とは異なり、投与される期間が限られているため採算を得にくい。しかし、開発に要する費用は他の医薬品と同様であること、新規性が高く人体に安全な化合物を作り出すことが困難であるなどの理由から、2000年以降、我が国を含む世界各国の製薬企業は抗菌薬の開発から次々と撤退した¹⁴⁾。

一方で、耐性菌問題は喫緊の課題であることが指摘されている。2050年には、年間1000万人が、耐性菌による感染症が原因で死亡するとの推計もある (<https://amr-review.org/>)。グラム陰性桿菌は、抗菌薬の選択圧の下で、上述のような突然変異や可動性遺伝子を介して耐性を獲得してきた。これら獲得性耐性因子として、第3世代・第4世代セファロスポリンを分解するESBLやカルバペネマーゼなどが挙げられ、世界的な拡散が懸念されている。そのような背景から、米国感染症学会は、2020年までに10種類の抗菌薬を上市することを目標に「10×20イニシアチブ」を掲げた¹⁴⁾。さらに、世界保健機関 (WHO) は、優先的に新規抗菌薬を開発すべき病原体リストを公表し (<https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>)、特にカルバペネム耐性アシネトバクター属菌、カルバペネム耐性緑膿菌、および第3世代セファロスポリン/カルバペネム耐性腸内細菌科細菌に対する薬剤の開発は重要であることを指摘した。

このような中、米国を中心に臨床応用が開始されている抗菌薬としてセフトロザン/タゾバクタムをはじめ海外で承認されているセフトジジム/アビバクタム、メロペネム/バボルバクタム、プラズマイシンおよびエラバシクリンなどがある^{15,16)} (Figure 2)。このうち、セフトロザン/タゾバクタムは我が国で承認され、市販されているがその他の薬剤は未だ開発や導入が進んでいない。

新たな治療戦略

抗菌ペプチド、シデロフォア分子のアナログであるラ

クトフェリン, レクチンの阻害物質, プロバイオティクスなどを感染症の治療に応用することが試みられてきた。上述のごとく, バイオフィーム形成は抗菌薬の作用を減弱させ, 感染症の慢性化に繋がる可能性があり, その治療法の開発は重要な課題である¹⁷⁾。鉄イオンのアナログであるガリウムがバイオフィームを破壊する作用を有することが報告された。ガリウムは既に米国で医薬品として使用されており, その安全性が確認されていることからその応用が期待される¹⁸⁾。

バクテリオファージは1940年代に感染症治療への応用が検討された。しかし, 多種・多様な抗菌薬が上市されたこと, 耐性株が容易に出現すること, 複数回投与することが困難なことなどの理由から東ヨーロッパ諸国以外では研究されなくなってきた。しかし, 最近のゲノム解析手法やゲノム編集技術の進歩と標的とする病原体のみを攻撃することができるというバクテリオファージの特性が相俟って, 多剤耐性菌に対するファージ療法が注目されている。もちろん, 通常のバクテリオファージはバイオフィーム内の菌を攻撃することはできない。しかし, バイオフィームの主成分であるDspBやEPSを分解する酵素を搭載したファージを人為的に作製し, バイオフィーム内の細菌にバクテリオファージを到達させる戦略も考えられている¹⁹⁾。それには, 複数種類のバクテリオファージを混合するカクテル療法が必要になるが, 技術的には特定の病原体のみを攻撃するファージを短時間で作成することも可能な時代になっている。筆者は, バクテリオファージは多剤耐性菌に対する有用な治療戦略の一つになると期待している。

おわりに

グラム陰性菌はグラム陽性菌にはない外膜を巧妙に使って, 外界からの異物の侵入に対抗して来た。さらに, グラム陰性菌は外来性遺伝子の獲得や内在性遺伝子の変異などにより非常に強かに環境に適応する能力を有している。今後, 人類が新たな抗菌薬や治療法を開発したとしても, グラム陰性菌は必ずそれらに対して適応することは明らかである。感染症は決してなくなる疾患である。新規治療薬の開発とともに適切な抗菌薬の適正使用が益々重要になると考えている。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文献

- 1) Smolders D, Hendriks B, Rogiers P, Mul M, Gordts B: Acetic acid as a decontamination method for ICU sink drains colonized by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and its effect on CPE infections. *J Hosp Infect* 2019; 102(1): 82-8.
- 2) Qiao M, Ying GG, Singer AC, Zhu YG: Review of antibiotic

- resistance in China and its environment. *Environ Int* 2018; 110: 160-72.
- 3) Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ: Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2018; 42(1): 68-80.
- 4) San Milan A: Evolution of plasmid-mediated antibiotic resistance in the clinical context. *Trends Microbiol* 2018; 26(12): 978-85.
- 5) D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, *et al.*: Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 2011; 477(7365): 457-61.
- 6) Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, *et al.*: Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One* 2012; 7(4): e34953.
- 7) Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, *et al.*: Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 2004; 304(5667): 66-74.
- 8) Poirel L, Héritier C, Nordmann P: Genetic and biochemical characterization of the chromosome-encoded class B beta-lactamases from *Shewanella livingstonensis* (SLB-1) and *Shewanella frigidimarina* (SFB-1). *J Antimicrob Chemother* 2005; 55(5): 680-5.
- 9) Hall BG, Barlow M: Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future. *Drug Resist Updat* 2004; 7(2): 111-23.
- 10) Kugelberg E, Lofmark S, Wretling B, Andersson DI: Reduction of the fitness burden of quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55(1): 22-30.
- 11) Johann DD, Pitout JDD, DeVinney R: *Escherichia coli* ST 131: a multidrug-resistant clone primed for global domination [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Res* 2017; pii: F1000 Faculty Rev-195.
- 12) Crabbé A, Jensen PØ, Bjarnsholt T, Coenye T: Antimicrobial Tolerance and Metabolic Adaptations in Microbial Biofilms. *Trends Microbiol* 2019; pii: S0966-842X (19) 30126-X.
- 13) Bigger JW: Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet* 1944; 244(6320): 497-500.
- 14) Boucher HW, Talbot GH, Benjamin DK Jr, Bradley J, Giddens RJ, Jones RN, *et al.*: 10×20 Progress—development of new drugs active against Gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2013; 56(12): 1685-94.
- 15) Draenert R, Seybold U, Grütznert E, Bogner JR: Novel antibiotics: are we still in the pre-post-antibiotic era? *Infection* 2015; 43(2): 145-51.
- 16) Karaiskos I, Lagou S, Pontikis K, Rapti V, Poulakou G: The "Old" and the "New" antibiotics for MDR Gram-negative pathogens: for whom, when, and how. *Front Public Health* 2019; 7: 151.
- 17) Chatterjee M, Anju CP, Biswas L, Anil Kumar V, Gopi Mohan C, Biswas R: Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *Int J Med Microbiol* 2016; 306(1): 48-58.
- 18) Kaneko Y, Thoendel M, Olakanmi O, Britigan BE, Singh PK: The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity. *J Clin Invest* 2007; 117(4): 877-88.
- 19) Motlagh AM, Bhattacharjee AS, Goel R: Biofilm control with natural and genetically-modified phages. *World J Microbiol Biotechnol* 2016; 32(4): 67.

〔連絡先：〒143-8540 東京都大田区大森西 5-21-16
東邦大学医学部微生物・感染症学講座 石井良和
E-mail: yishii@med.toho-u.ac.jp〕

***Survival Strategies of Antibiotic-resistant Gram-negative Organisms
and the Development of Future Treatment Option for Infectious Diseases***

Yoshikazu ISHII

Department of Microbiology and Infectious Diseases, Toho University School of Medicine

Abstract

Whenever a new antibacterial drug is applied clinically, resistant bacteria emerge. However, the strain carrying the resistance factor has disadvantages with regard to survival, such as slower growth speed, compared with the susceptible strain. Therefore, resistant bacteria are thought to survive only in special environments, such as medical facilities. However, in recent years, resistant bacteria that cause community infections have emerged, overcoming these adverse situations. In this manuscript, I outline what kind of strategies the resistant Gram-negative organisms spread in the community. In addition, I will discuss the current status and future prospects of the development of treatment option for infectious disease with personal views.

Key words: antibiotics, antimicrobial-resistant organism, Gram-negative bacteria, survival