研究課題名 新規化合物が緑膿菌の抗菌薬抵抗性に及ぼす影響

1. 研究目的と成果内容

感染症の治療において薬剤感受性試験を行い、最小発育阻止濃度 (MIC) の結果に基づき適切な抗菌薬を選択するが、それにもかかわらず十分な効果が得られないことがしばしば起こり、その原因の一つとして抗菌薬抵抗性が注目されている。抗菌薬抵抗性は、耐性遺伝子を獲得した薬剤耐性とは異なり、一時的な遺伝子発現の変化により起こる現象とされているが、そのメカニズムはまだ解明されていない。これまでにマウス感染実験において、緑膿菌クオラムセンシングのシグナル分子オートインデューサーのアナログである新規化合物が、抗菌活性は持たないものの、抗菌薬と併用することにより抗菌薬の効果を増強することを見出している。そこで本研究では、この新規化合物を用いて *in vitro* での殺菌試験を行い、化合物の抗菌薬抵抗性への影響やその作用機序の解明を目的とした。

緑膿菌野生株での浮遊菌における殺菌試験においてピアペネム、レボフロキサシン、トブラマイシンの併用効果を検討したところ、抗菌薬単独と比較して、化合物を併用した群では生存率が減少していた。また、化合物の併用による抗菌薬の MIC の変化は確認されなかったことから、この化合物は緑膿菌の抗菌薬抵抗性に影響を与えていると考えられた。バイオフィーム形成菌での殺菌試験を行ったところ、浮遊菌と同様に抗菌薬単独に比べ化合物を併用することにより生存率が減少していた。加えて、薬剤耐性緑膿菌においても抗菌薬と化合物の併用効果が確認された。化合物作用後の遺伝子発現をリアルタイム PCR にて解析したところ、クオラムセンシングを直接制御する遺伝子の発現には差が見られなかったが、シグマ因子である *rpoS* 遺伝子の発現が有意に抑制されていた。このことから、新規化合物は *rpoS* 遺伝子の発現を抑制することで抗菌薬抵抗性を減少させていると考えられた。

2. 自己評価

緑膿菌における抗菌薬抵抗性に関連する要因の一つとして *rpoS* 遺伝子を見出した。また、この化合物の抗菌薬との併用効果は薬剤耐性菌においても確認されたことから、化合物の作用機序をより明らかにすることで難治性緑膿菌感染症に対する新しい治療法開発の一助となると考えられる。

3. 学会発表

- 1) 新規化合物によるレボフロキサシン及びトブラマイシン殺菌作用の増強効果. 第30回日本バイオフィルム学会学術集会, 東京, 2016年7月2日, 天羽崇, 村上圭史, 狩山玲子, 弘田克彦, 公文裕巳, 三宅洋一郎. 口頭発表
- 2) 新規化合物のバイオフィルムへの影響と作用機序について. 第69回日本細菌学会中国・四国支部総会, 香川, 2016年10月15~16日, 天羽崇, 村上圭史, 狩山玲子, 弘田克彦, 三宅洋一郎. 口頭発表
- 3) 呼吸器由来緑膿菌における病原性と抗菌薬抵抗性との関連性について. 第40回徳島医学検査学会, 徳島, 2016年12月11日, 藤枝真一, 小川翔登, 村上圭史, 天羽崇, 三宅洋一郎, 佐藤雅美, 笹田倫子, 菅崎幹樹, 香川葉子, 森本悠里, 東桃代, 櫻井明子, 片岡圭子. 口頭発表
- 4) 緑膿菌オートインデューサー類似化合物が抗菌薬抵抗性に及ぼす影響. 第40回徳島医学検査学会, 徳島, 2016年12月11日, 小川翔登, 藤枝真一, 村上圭史, 天羽崇, 三宅洋一郎, 佐藤雅美, 笹田倫子, 菅崎幹樹, 香川葉子, 森本悠里, 東桃代, 櫻井明子, 片岡圭子. 口頭発表
- 5) 緑膿菌の抗菌薬抵抗性に及ぼす Autoinducer Analog の作用機序について. 第51回緑膿菌感染症研究会, 大分, 2017年2月10~11日, 村上圭史, 狩山玲子, 公文裕巳, 三宅洋一郎, 天羽崇, 菅裕明, 五十嵐潤. 口頭発表
- 6) 緑膿菌における新規化合物の抗菌薬抵抗性に対する作用機序の解析. 第90回日本細菌学会総会, 仙台, 2017年3月19~21日, 天羽崇, 村上圭史, 狩山玲子, 弘田克彦, 三宅洋一郎. ポスター

4. 論文

- 1) RpoN modulates carbapenem tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* through Pseudomonas quinolone signal and PqsE. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Volume 60, Issue 10, p5752-5764, October 2016, D. Viducic, K. Murakami, T. Amoh, T. Ono, Y. Miyake.
- 2) A *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing autoinducer analog enhances the activity of antibiotics against resistant strains. Journal of Medical Investigation, Volume 64, No.1・2, p101-109, February 2017, T. Amoh, K. Murakami, R. Kariyama, K. Hori, Y. Irie, D. Viducic, K. Hirota, J. Igarashi, H. Suga, H. Kumon, and Y. Miyake.
- 3) Interplay between the quorum sensing regulator VqsR and the Pseudomonas quinolone signal in mediating carbapenem tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. Research in Microbiology, in press 2017, D. Viducic, K. Murakami, T. Amoh, T. Ono, Y. Miyake.

4) Explorative gene analysis of antibiotic tolerance-related genes in adherent and biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Infection and Chemotherapy, in press 2017, K. Murakami, T. Ono, Y. Noma, I. Minase, T. Amoh, Y. Irie, K. Hirota, Y. Miyake.