

## 誘導型MLS<sub>B</sub>耐性黄色ブドウ球菌におけるマクロライド系薬の耐性誘導能の定量化

### A Quantitative Determination of Inducibility by Macrolide Antibiotics in Inducible Resistant *Staphylococcus aureus* to Macrolide- Lincosamide-Streptogramin Type B Antibiotics

遠藤 菊太郎\* 武田 龍馬\*\* 伊藤 三佳\*\*\*

Kikutarou Endou, Ryoma Takeda, and Mika Itoh

#### Abstract

*Staphylococcus aureus* ISP447, in its resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin type B (MLS<sub>B</sub>) antibiotics, is induced in the presence of the 14-membered ring macrolides. First, it was tested for qualitative inducible resistance using the disk diffusion method. As a result, azithromycin of 15-membered ring macrolide with both clarithromycin and erythromycin, which belongs to the 14-membered ring macrolide, has an induced resistance to MLS<sub>B</sub> drugs. However, ketolides such as telithromycin belonging to the 14-membered ring macrolide in this strain, does not induce resistance to MLS<sub>B</sub> antibiotics.

This study has investigated quantitatively resistant derivatives of 14-membered and 15-membered ring macrolides and ketolides using *Staphylococcus aureus* ISP447. It is possible to analyze the structure-activity relationship between the inducibility of resistance to MLS<sub>B</sub> drugs and the chemical structure of the antimicrobial agents by using the quantitative results. Measurement of the minimum inhibitory concentration (MIC) was obtained using the checkerboard method by broth microdilution method. FIC index is an indicator to test the interaction between the two drugs from the MIC values which were determined using the checkerboard method. Multiple regression analysis was used to obtain the partial regression coefficients using, for the purpose variable, the FIC index and explanatory variable substituent of the common lactone ring. As a result, the substituent at the 3-position of the lactone ring macrolide, which is a common structure, has contributed most to the induction of resistance. Multiple correlation coefficient indicated the contribution rate was very high at 0.9353. Therefore, the results of this multiple regression analysis is considered to be reasonable.

#### 1. 目的

自然界ならびに臨床由来のマクロライド (Mac) 系薬耐性黄色ブドウ球菌の多くは、その耐性表現型により、構成型耐性菌群と誘導型耐性菌群に2大別される。誘導型耐性菌群において耐性誘導剤となる薬剤に、エリスロマイシン (EM)、クラリスロマイシン (CAM) を初めとする14員環 Mac などが知られている(1, 2, 3)。しかし、ラクトン環の3位がケトンとなったケトライド系薬は、誘導型耐性菌に対して耐性誘導を起こさない(3, 4)。そこで今回、MLS<sub>B</sub>誘導型耐性黄色ブドウ球菌を用いて、14員環、15員環 Mac 系薬、ケトライド系薬の耐性誘導能を最小発育濃度 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) を測定し、耐性誘導能を定量化することとした。このことより、これらの Mac 系薬の化学構造のどの部

分が耐性誘導能に関与しているかを多変量解析の手法である重回帰分析を用いて検討し、耐性誘導能を有しない Mac 系薬の化合物の開発に寄与することを目的とした。

#### 2. 実験方法と材料

##### 2.1 使用菌株

MLS<sub>B</sub>誘導型耐性を示す *Staphylococcus aureus* ISP447 を用いた。

##### 2.2 抗菌薬

14員環 Mac である EM、オレアンドマイシン (OL)、トリアセチルオレアンドマイシン (TAO)、16員環 Mac であるタイロシン (TS)、スピラマイシン (SPM)、ロザミシン (RSM) は SIGMA 社より購入した。14員環 Mac で

\*北海道科学大学保健医療学部理学療法学科

\*\*中村記念病院薬剤部

\*\*\*北海道科学大学保健医療学部看護学科

ある CAM、ケトライド系薬の FMA1485 は大正製薬、16 員環 Mac であるジョサマイシン (JM) は東洋醸造、ケトライド系薬であるテリスロマイシン (TEL) はヘキストマリオンセル社、セスロマイシン (ABT773) は ABBOTT LABORATORIES から分与されたものを用いた。15 員環 Mac であるアジスロマイシン (AZM) をコスモ・バイオ社から購入した。リンコサマイドである LCM、CLDM を日本 Upjohn 社より購入した。ストレプトグラミン B のミカマイシン B (MKM-B) は萬有製薬より分与された MKM 混合物から分離、精製したものを用いた。耐性誘導能の検討に用いた抗菌薬の構造式を Fig. 1 に示した。

### 2.3 薬物含有ディスクの作製

EM、CAM、TAO、AZM、TEL、RSM、JM、SPM、MCM II、MKM-A、MKM-B は純エタノール、OL、TS、LCM、CLDM は超純水、ABT-773、FMA1485 はメタノールに溶解し、以下の調製に用いた。EM、CAM、TAO は  $10 \mu\text{g}/\text{disk}$ 、AZM、JM、TS は  $25 \mu\text{g}/\text{disk}$ 、TEL、ABT-773 は  $0.1 \mu\text{g}/\text{disk}$ 、FMA1485 は  $0.025 \mu\text{g}/\text{disk}$ 、OL、RSM、CLDM は  $1 \mu\text{g}/\text{disk}$ 、SPM、MKM-B は  $25 \mu\text{g}/\text{disk}$ 、LCM は  $5 \mu\text{g}/\text{disk}$  のディスクを作製した(4, 5)。

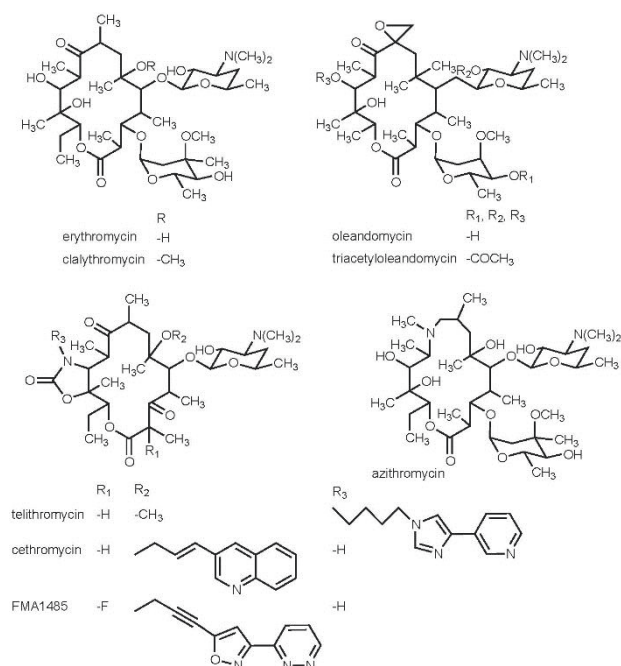


Fig.1 The chemical structure of 14-membered ring, 15-membered ring macrolide and ketolide that were used in the examination of inducible resistant

### 2.4 使用培地

定性的耐性誘導能の検討のためのディスク拡散法には Ind. Base agar として pepton (DIFCO) 5g, yeast extract (DIFCO) 5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (小宗化学薬品) 1g、

dextrose (DIFCO) 2g, agar granulated (BBL) 15g を精製水 1L 中に溶解したものを、菌懸濁用として Ind. Soft agar (Ind. Base agar の寒天量を 7g としたもの) を用いた。

定量的耐性誘導能の検討のための最小発育阻止濃度測定のために日本化学療法学会標準法の微量液体希釈法(6)に従った塩化カルシウム及び塩化マグネシウム添加した Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth (CAMHB) を用いた。

### 2.5 ディスク拡散法による各種 Mac、ケトライド系薬の耐性誘導能試験

黄色ブドウ球菌は TSA (BBL) で 37°C、24 時間培養後、滅菌生理食塩水に 0.5 McFarland 標準濁度 ( $1 \times 10^8$  CFU/mL) に懸濁した。この菌液 0.5 mL に Ind. Soft agar 8~9 mL を加え、Ind. Base agar (作成済みの栄研化学滅菌 1 号角シャーレ) に重層した。その寒天平板上に各薬剤含有ディスクを置き、ブランクとして薬剤を含有しないディスク ( $0 \mu\text{g}/\text{disk}$ ) を対照として 37°C、24 時間培養した。耐性誘導剤の対面に置かれたディスク周囲の阻止帯の形状により、耐性誘導能を判定した。円形阻止帯の場合は耐性誘導能なし、D 型阻止帯の場合は耐性誘導能ありとした(4, 5)。

### 2.6 微量液体希釈法を用いたチェッカーボード法による耐性誘導能試験

耐性誘導能の評価は、日本化学療法学会標準法の微量液体希釈法(6)を用いて得られる MIC 値の測定によった。チェッカーボード法(7, 8)は、96 穴 U 型マイクロプレートを用い、各種耐性誘導剤と各種抗生物質を種々の濃度に組み合わせた薬剤含有 CAMHB 培地をマイクロプレート 1 ウェルあたり  $100 \mu\text{L}$  にとした。菌液は滅菌生理食塩水で 0.5 McFarland に懸濁した後、滅菌生理食塩水で 10 倍に希釈し、これを  $5 \mu\text{L}$ /ウェルに分注し、37°C、24 時間培養した。

### 2.7 耐性誘導能の評価

抗菌薬単独及び他の抗菌薬を共存させた場合の *S. aureus* ISP447 における MIC 値を測定した。測定した MIC 値を用いて、次に示す計算式(7, 8)により定義する Fractional Inhibitory Concentration index (FIC index) を算出した。一般的に、得られた FIC index が、0.5 以下の場合を相乗作用、0.5 を越え 1 以下の場合を相加作用、1 から 2 を不関作用、2 を越える場合を拮抗作用として評価している。耐性誘導は拮抗作用である

FIC index が 2 を超える場合、耐性誘導能を有すると定義した。また、今回は MIC 値の上昇を観察する実験であり、最大 MIC 値を用いて最大 FIC index を算出した。

$$\text{FIC index} = \frac{\text{薬剤B存在下の薬剤AのMIC値}}{\text{薬剤A単独のMIC値}} + \frac{\text{薬剤A存在下の薬剤BのMIC値}}{\text{薬剤B単独のMIC値}}$$

## 2.8 重回帰分析

耐性誘導能と目的変数の設定は *S. aureus* ISP447 株が耐性となった場合、RSM、JM、SPM、TS、LCM、CLDM、MKM-B に対する MIC 値が上昇する事により、FIC index の平均値を耐性誘導能の強さの指標とし、これを目的変数とした。次に薬物の化学構造の置換基を説明変数とするため、Fig. 1 に示した化学構造である 14, 15 員環マクロライド及びケトライド系薬の共通母核構造であり、その母核に結合する置換基 (Ri) の原子団の質量数を説明変数とした。この変数を用いて多変量解析の手法である重回帰分析をアップル社製コンピュータ用多変量解析 Ver. 1.0 b Excel 2004 対応版 (株式会社エスミ) を用いて行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 定性的耐性誘導能

Fig. 2 に示すように EM ディスクの対面に置かれた JM ディスク周囲の発育阻止帯は、ブランク (0 µg/ disk) の対面に置かれた薬剤のディスクの周囲に形成された円形の発育阻止帯と比較すると、明らかに D 型であり、EM によって JM が耐性となった。

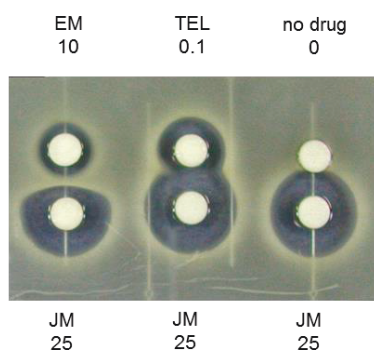


Fig. 2 The effect of erythromycin and telithromycin on the *Staphylococcus aureus* ISP447 against josamycin

EM, 10 µg/disk; TEL, 0.1 µg/disk; JM, 25 µg/disk  
Abbreviations: EM, erythromycin; TEL, telithromycin;  
JM, josamycin

同様に 14 員環 Mac の EM、CAM によって 16 員環 Mac である JM、RSM、SPM、TS、リンコサマイドである LCM、CLDM 及びストレプトグラミン B の MKM-B のディスクの周りに D 型の発育阻止帯が形成された。15 員環 Mac の AZM の場合も EM の場合と同様の結果となった。この結果より、EM、CAM 及び AZM は、*S. aureus* ISP447 に対して、耐性誘導能を有することが明らかとなった。しかし、14 員環 Mac の OL、TAO の場合は、その対面に置かれた 16 員環 Mac の RSM、JM、SPM、TS、LCM、CLDM 及び MKM-B のディスクの周囲は、ほぼ円形の発育阻止帯が形成された。さらに、Fig. 2 に示すように TEL のディスクの対面に置かれた JM の発育阻止帯は円形であった。同様にケトライド系薬の ABT-773 及び FMA1485 によっても、16 員環 Mac の RSM、SPM、TS、LCM、CLDM、MKM-B のいずれのディスクの周囲も発育阻止帯は円形であった。このことより、*S. aureus* ISP447 に対して、OL、TAO とケトライド系薬は、耐性誘導能を持たないことが明らかとなった。

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of macrolide, ketolide, lincosamide, and streptogramin type B compounds against *Staphylococcus aureus* ISP447

Compounds	MIC (µg/mL)
14-membered ring macrolide	
erythromycin	>128
clarithromycin	>128
oleandomycin	64
triacyloleandomycin	12.8
Ketolide	
telithromycin	0.05
cethromycin (ABT773)	0.025
FMA1485	0.025
15-membered ring macrolide	
azithromycin	>128
16-membered ring macrolide	
josamycin	1
spiramycin	4
tylosin	1
rosamicin	0.125
Lincosamide	
lincomycin	1
clindamycin	0.125
Streptogramin type B	
mikamycin B	8

### 3.2 チェッカーボード法による各種 MLS<sub>B</sub> 及びケトライド系薬の MIC 値

*S. aureus* ISP447 に対する各種抗菌薬の単独の MIC 値を Table 1 に示した。この MIC 値を基準として、14

Table 2. The combination effects of 16-membered ring macrolide, lincosamide and mikamycin B in the presence of 14-, 15-membered ring macrolide and ketolide against *Staphylococcus aureus* ISP447

Compounds	alone	EM	CAM	Combination in the presence of					
				OL	TAO	AZM	TEL	ABT773	FMA1485
Maximum MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )									
JM	1	>128	>128	2	2	>128	1	1	1
SPM	4	>128	>128	4	8	>128	4	4	4
TS	1	>128	>128	1	1	>128	1	1	1
RSM	0.125	>128	>128	0.125	0.125	>128	0.125	0.125	0.125
LCM	1	>128	>128	1	1	>128	1	1	1
CLDM	0.125	>128	>128	0.25	0.5	>128	0.125	0.125	0.125
MKM-B	8	>128	>128	8	8	>128	8	8	8

Abbreviations: EM, erythromycin; CAM, clarithromycin; OL, oleandomycin; TAO, triacetyloleandomycin; AZM, azithromycin; TEL, telithromycin; ABT-773, cethromycin; JM, josamycin; SPM, spiramycin; TS, tylosin; RSM, rosamicin; LCM, lincomycin; CLDM, clindamycin; MKM-B, mikamycin B

員環 Mac の EM、CAM、OL、TAO、15 員環 Mac の AZM、ケ時の MIC 値は、Table 2 に示した。

Table 2 に示すように EM、CAM および AZM 存在下において、JM をはじめとして、SPM、TS、RSM、TS、LCM、CLDM 及び MKM-B すべての抗菌薬の MIC 値が最大 128 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 以上に上昇した。これは、*S. aureus* ISP447 に対する抗菌薬単独時の MIC 値に対して、EM、CAM、AZM を共存したときの MIC 値が最大で RSM、CLDM では 1024 倍、JM、LCM、TS では 128 倍、SPM では 32 倍、MKM-B では 16 倍より大きく上昇した。

しかし、14 員環 Mac の OL、TAO が共存したときには RSM、SPM、TS、LCM、MKM-B においては MIC 値の上昇はなく、JM、CLDM においては最大で 2~4 倍に上昇した (Table 2)。

ケトライド系薬の TEL、ABT-773、FMA1485 が共存したとき、すべての抗生物質の MIC 値に上昇はみられなかった (Table 2)。従って TEL、ABT-773、FMA1485 は耐性誘導能がないことが定量的実験からも明らかとなった。この結果は、先に示したディスク拡散法による耐性誘導能の評価と高い整合性が得られた。

### 3.3 FIC index を用いた耐性誘導能の定量的構造活性相関

抗生物質に関する多変量解析の手法を用いた研究は、EM 誘導体や 6-デオキシテトラサイクリン誘導体における置換基パラメータをダミー変数として重回帰分析 (Free-Wilson 法) (9) による構造活性相関が報告されている (9, 10)。*S. aureus* ISP447 における FIC index を

トライド系薬の TEL、ABT-773 及び FMA1485 が共存した算出し、耐性誘導能を検討した。抗菌薬における耐性誘導能の定量的指標として FIC index の最大値とした。著者は、抗菌薬の化学構造から Fig. 3 に示す太線を共通母核とし、各抗菌薬の異なる置換基  $R_1$  から  $R_5$  をダミー変数ではなく、質量数を説明変数とした。それぞれを Table 3 に示した。この数値を基に耐性誘導活性と置換基との相関関係を重回帰分析した。このことより ISP447 株に対する耐性誘導能がどの置換基による寄与が大きいかを推定することが可能となった。その結果、Table 3 に示した *S. aureus* ISP447 株に対する 8 種の薬剤の FIC index と  $R_1$  から  $R_5$  までの置換基の質量数との相関は  $R_1$ 、 $R_5$  の標準偏回帰係数、すなわち寄与率がそれぞれ 0.6227、0.3883 であった。他の置換基は高い値を示さなかった。

$R_1$  は 14 員環 Mac、15 員環 Mac において糖があり、ケトライド系薬ではケトン基である。14 員環 Mac の EM、CAM、15 員環 Mac の AZM は耐性誘導能を有し、ケトライド系薬は無いことから、 $R_1$  の糖が耐性誘導に重要である事を示唆している。また、標準偏回帰係数も  $R_5$  の値より高く、最も影響を与えている基である。 $R_5$  は 14 員環 Mac の EM、CAM、15 員環 Mac の AZM、ケトライド系薬がエチル基で、14 員環の OL、TAO はメチル基である。また、この解析の重回帰係数、すなわち寄与率は 0.9353 であり精度が高く、重回帰モデルは妥当であると考えた。

Table 3. The average value of the FIC index in *S.aureus* ISP447 and the mass number of substituent of 14-membered ring macrolide, 15-membered ring macrolide and the ketolide

Compounds	Average value of the FIC index	Mass number of substituent				
		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Erythromycin	78.181	175	17	15	17	29
Clarithromycin	97.152	175	31	15	17	29
Oleandomycin	1.039	161	1	30	17	15
Triacetyloleandomycin	1.257	203	1	30	59	15
Azithromycin	51.286	175	17	15	17	29
Telithromycin	1.207	16	31	15	272	29
Cethromycin	1.259	16	184	15	59	29
FMA1485	1.259	16	202	15	59	29

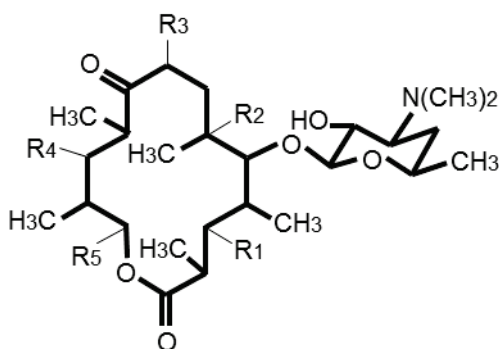


Fig. 3 A relationship between chemical structure and inducible resistance activity  
\*The bold line shows the chemical structure of common macrolide

#### 4. まとめ

本研究では *S. aureus* ISP447 に対するケトライド系薬と耐性誘導剤となる Mac の耐性誘導能を定性的、定量的に検討すること、次にそれぞれの化学構造、構造活性相関を解析した。ディスク拡散法を用いた定性的検討により、14員環 Mac の EM、CAM、15員環 Mac の AZM は耐性誘導能が有することが明らかとなった。14員環 Mac の OL、TA0 及びケトライド系薬の TEL、ABT-773、FMA1485 は耐性誘導能を認めなかった。

定量的検討によって、EM、CAM、AZM は共存した抗菌薬の MIC 値を、その抗菌薬の単独での MIC 値より 10~1024 倍と大きく上昇させ、耐性を誘導した。しかし、OL、TA0、ケトライド系薬の濃度が変化しても共存した抗菌薬の MIC 値に変化はなく、耐性を誘導しなかった。このことは、定性的な耐性誘導能の評価と高い整合性が認められた。

耐性誘導能を有する Mac と耐性誘導能を有しないケ

トライド系薬の化学構造の違いは、ラクトン環の 3 位に結合する置換基があり、この違いが耐性誘導能の有無に最も関係があることが示唆された。

#### 5. 参考文献

- (1) 平松和史、門田淳一. 薬剤耐性菌感染症に対する予防・治療戦略. 日本化学療法学会雑誌. Vol. 59, 2011, pp. 151-157.
- (2) 遠藤菊太郎、中島良徳. マクロライド系薬剤. 日本臨牀. 5: 2007, pp. 226-232.
- (3) Mayumi Matsuoka, Kikutarou Endou, and Yoshinori Nakajima. A dyadic plasmid that shows MLS and PMS resistance in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiology Letters. Vol. 148, 1997, pp. 91-96.
- (4) 袴田浩. テリスロマイシン耐性肺炎球菌のマクロライド薬耐性機序に関する基礎研究. 平成 21 年度北海道薬科大学大学院修士論文, 2009.
- (5) 中島良徳、遠藤菊太郎. グラム陽性菌の細胞および細胞下レベルにおける telithromycin の作用機序の検討ー耐性誘導能からリボソーム親和性まで作用機序の検討ー. 日本化学療法学会雑誌. Vol. 51, 2003, pp. 83-93.
- (6) 微量液体希釈による MIC 測定法(微量液体希釈法)ー日本化学療法学会基準法ー. 日本化学療法学会. Vol. 38, 1990, pp. 102-107.
- (7) 渋谷泰寛、大野高司、伊東紘一. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する vancomycin と cephem 系薬の併用効果. 日本化学療法学会雑誌. Vol. 51, 2003, pp. 621-625.

- (8) 柳沢千恵、花木秀明、大石智洋、上原一晃、山口幸恵、松井秀仁、砂川慶介.  $\beta$ -lactam antibiotic induced vancomycin-resistant MRSA (BIVR)に対する pazufloxacin と抗 MRSA 薬の併用効果. 日本抗生物質学術協議会. Vol. 58, 2005, pp. 11-15.
- (9) S. M. Free and J. W. Wilson. A mathematical contribution to structure-activity studies. J. Medical Chem., Vol. 7, 1964, pp. 395-399.
- (10) Y. C. Martin, P. H. Jones, T. J. Perum, W. E. Grundy, S. Bell, R. R. Bower and N. L. Shipkowitz. Chemical modification of erythromycin antibiotics. 4. Structure-activity relations of erythromycin esters J. Medical Chem., Vol. 15, 1972, pp. 635-638