

博士論文

論文題目 高度バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌
(VRSA)感染症に対する治療法の確立

氏名 田淵 史晃

博士学位論文

高度バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(VRSA)

感染症に対する治療法の確立

東京大学大学院 薬学系研究科

薬科学専攻 微生物薬品化学教室

平成 25 年度入学 田淵 史晃

目次

序論	1
本論	6
第一章 高度 VCM 耐性 MRSA (VRSA) の取得	7
第一節 緒言	8
第二節 材料と方法	9
第三節 結果	
第一項 変異原処理と薬剤選択による高度 VCM 耐性株の分離	12
第二項 取得した変異株の VCM 耐性の測定	13
第四節 考察	14
第二章 VRSA の高度バンコマイシン耐性機構の解明	16
第一節 緒言	17
第二節 材料と方法	18
第三節 結果	
第一項 VCM 耐性 MRSA の他の抗生物質への感受性試験	20
第二項 透過型電子顕微鏡による VRSA の細胞壁の観察	21
第三項 高度バンコマイシン耐性株の遺伝子変異の同定	22
第四節 考察	24
第三章 カイコを用いた VRSA に対する抗生物質の併用療法の評価	27
第一節 緒言	28
第二節 材料と方法	30
第三節 結果	
第一項 VCM 耐性 MRSA (VRSA) の増殖阻害に対する <i>in vitro</i>	32
での VCM と各種 β -ラクタム系抗生物質の併用効果	

第二項	カイク感染モデルを用いた、VCM と β -ラクタム系 抗生物質の併用に対する治療効果の評価	34
第三項	VCM との併用により VCM の抗菌活性を 上昇させる抗生物質の探索	35
第四節	考察	36
第四章	総括と今後の展望	39
参考文献		43
図表		51
発表論文		77
謝辞		78

序論

生物は何故、かよりの如く多様であり、複雑なのであろうか。人類の永遠の謎である。現在地球上には、最大で1億種の生物が存在することが推定されている。すぐに思い浮かぶだけでも、その形態や行動は様々であり、何故そのような奇天烈な特徴を示すのか。私は常々、興味と疑問を持ち続けてきており、現在も生物学の研究を志している。

生物とは一般的に、(i) 膜構造により、外界から隔離されており、(ii) エネルギー代謝、物質代謝を行い、(iii) 自己を複製する、ことが条件として挙げられることが多い。また、この他にも「生物」を定義づける大きな特徴として、「生物は進化する」ことが挙げられるだろう。Darwin および Wallace が、19世紀半ばに自然選択説を唱えて以来、生物進化のメカニズムについては、常に人々の関心の的であった (1)。その一つの解釈として、以下のような考え方が現代の主流である。同種の集団内に生じたランダムな遺伝的変異の中からその時の環境に、より有利な個体が選択され、子孫を残していく。連続的な遺伝的変異を蓄積することで、漸進的に環境に適応した個体とその子孫が集団内の多数派となり、いずれ元の種とは別の種として独立する。生物は、その誕生の瞬間以来、このプロセスを繰り返すことにより、長大な時間の中で連続的に変化することで、文字通り無数の種を作り上げてきた。生物は、否が応にも進化するのであり、生物の進化を研究することは、生物の多様性を研究し、生物の本質を知ることと同義である、と私は考える。

我々が、生物と言われた場合には、肉眼で観察できる、比較的大きな多細胞生物を無意識に想像しがちである。しかしながら、生物の系統樹をさかのぼった場合に、進化の根っこの部分に位置しているのは、アメーバであり、カビであり、バクテリアといった単細胞生物なのである。一見これらの単細胞生物を、我々は単純な生物であると考え軽視したくなるが、これらの生物は、多細胞生物の特徴の原初とも呼べる現象を有しているなど、十分に複雑な反応システムの集合体である。我々は、「細胞」を基本としている点において、単細胞生物と何ら変わりはないのである。特に、バクテリアなどの原核生物は、地球上の生物の歴史の半分を占めている。それ故に、我々ヒトを含めた生物の進化を知る上で、バクテリアは大変重要な研究対象である。多くのバクテリアの世代時

間は、多細胞生物の細胞のそれに比べ圧倒的に短い。そのため、バクテリアは、世代間の環境への適応の差=進化を知る上で、この上ないメリットを有している。そこで私は、バクテリアを研究材料とすることで、進化を含む生物の不思議に迫れるのではないかと考えた。

生物が競争し、同種他個体に比べて環境に有利になるためには、どのような形質が適応的になることが重要であろうか。私はその例として2つのパターンをすぐに思いついた。まず、一つ目は、多種を攻撃する武器を徐々に進化させていくことである。ランダムな遺伝的変異により、同じ環境を共有している別種を攻撃する武器の能力を獲得した個体は、同種内で適応的となり、集団の多数派となる可能性がある。一方、二つ目として、ランダムな遺伝的変異により、毒などに耐性を有する個体が選択され、その遺伝的形質を有する個体が増殖することで、遺伝的連続性を保つことができるようになると考えられる。

以上の現象は、すでに実際に観察されている。抗生物質は、周囲に存在する細菌種へ特異的に働く毒として、真菌や放線菌が合成した二次代謝産物であり、生物が進化の末に獲得した環境への適応策であると言える。また、抗生物質への耐性菌の出現は、ランダムな遺伝子変異の中から、抗生物質に対して耐性を示す遺伝子変異が選択されることにより、抗生物質の存在環境に適応した結果である。

このように、抗生物質の産生による他菌種への攻撃や、それらから身を守るための耐性機構の獲得という現象自体が、生物の進化を極めて短いタイムスケールで再現していると考えられる。

1928年に Fleming により、抗生物質として初めて発見されたペニシリン (2) が、第二次世界大戦中に大量生産され、普及して以来、多種多様な抗生物質が積極的に探索され、多くの人類の命を救ってきた。それまでの人類の死因の多くが細菌による感染症により占められており、それ故に抗生物質は人類の寿命の延長に多大な貢献をしてきた。優秀な抗生物質の共通の特性として、病原細菌への高い選択毒性が挙げられる。これは、

病原細菌にのみ特異的に存在する分子を標的とすることで、人体への影響を最小限に抑えながら、細菌に対して殺菌的もしくは静菌的に作用することによりなされる。抗生物質は真核生物であるヒトと、原核生物である細菌の違いを認識し、強調する。そのため、生物の細胞レベルにおける差が、何から、どのように生まれるのかという生物多様性に関する問いに答えるために、抗生物質の作用メカニズムの研究は大変重要である。

一方、ペニシリンの発見から数年後には、薬剤耐性菌の出現が報告されており (3)、細菌側も抗生物質による攻撃という高い選択圧が存在する環境において、短い世代時間を武器にペニシリン分解酵素を作り出すなどの対策を講じてきた (4)。繰り返すが、細菌の抗生物質に対する耐性化は、他でもない生物の進化現象であり、大変興味深い。また、抗生物質の耐性メカニズムを分子レベルで解明することは、薬剤耐性菌感染症の診断方法の開発や、これに対する新規抗生物質の探索を促すことから、純粋な生物学的な興味以外からも、医学、薬学的に極めて重要であり、積極的に取り組むべき課題であると私は考えた。

1950年代後半に、ペニシリン分解酵素を獲得したペニシリン耐性菌に有効な半合成ペニシリンとして、メチシリンが開発された。メチシリンは、ペニシリン耐性菌に著効を示したが、その多用により、数年後にはメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) が出現した (5)。MRSA は、そのゲノム DNA 上に外来遺伝子領域である SCCmec 領域を有しており (6)、その領域内に含まれる、 β -ラクタム系抗生物質との親和性が低い PBP2' をコードする *mecA* 遺伝子を発現することで、メチシリンを始めとした各 β -ラクタム系抗生物質に高度耐性を示すことが報告されている (7, 8)。さらに MRSA は、 β -ラクタム系抗生物質以外にも、様々な作用機序を有する抗生物質に対する耐性を獲得することで、人類にとって、大きな脅威となった (9)。

人類は、この MRSA に対して薬効を示す新たな抗生物質として、バンコマイシンを発見することができた (10)。バンコマイシンは、MRSA に対して優れた抗菌作用を示し、現在も MRSA 感染症治療薬の第一選択薬として頻用されている。

しかしながら近年臨床現場において、バンコマイシンに対して耐性を示す黄色ブドウ球菌の出現が報告され始めている。私は、将来の高度バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症の蔓延に備え、その治療方法の候補を確立しておく必要があると考え、研究に着手した。

本研究を始めるにあたり私はまず、バンコマイシン感受性の臨床分離 MRSA を変異原処理した後に、様々な濃度のバンコマイシンを含む培地で選択することを繰り返すことにより、高度バンコマイシン耐性 MRSA (VRSA) を取得し、モデル菌株の樹立を試みた。

次に取得した株の高度バンコマイシン耐性化機構の解明を、表現型解析およびゲノム解析により試みた。

さらに、取得した VRSA に対して有効な治療方法を、*in vitro* およびカイコを用いた *in vivo* の系により探索した。

本論

第一章

高度 VCM 耐性 MRSA (VRSA) の取得

第一節 緒言

1960年代に出現した MRSA に対する特効薬であるバンコマイシン (VCM) に対して高度耐性を示す黄色ブドウ球菌 (VRSA; MIC ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$, (11)) の出現が2002年を皮切りに、散発的に報告され始めている (12)。これらの株では *vanA* 遺伝子などが、外来因子としてトランスポゾンやプラスミドにより外挿され、バンコマイシンの作用点となるペプチドグリカン伸長点の GlcNAc-MurNAc 単位末端の D-アラニン-D-アラニンを、D-アラニン-D-乳酸に置換することで、バンコマイシンの結合を阻害することにより、高度バンコマイシン耐性となる (13)。しかしながら、この外来因子による VRSA は、現在のところ限局された地域でのみしか臨床において検出されておらず、世界的な流行には至っていない。

一方、近年、VCM に対して中程度の耐性を示す黄色ブドウ球菌 VISA (MIC =4~8 $\mu\text{g/ml}$, (11)) やヘテロ VISA (hVISA; MIC =2~4 $\mu\text{g/ml}$, (11)) の出現が世界中で報告されている (14)。これらの株については、全ゲノム配列の比較により、複数の遺伝子変異が VCM 耐性に関与していることが報告されている (15)。これらの株が更なる遺伝子変異を蓄積することで高度 VCM 耐性化し、感染症のアウトブレイクを引き起こすことが危惧されているが、こうした株に対する新たな治療方法は確立されていない。

私は本研究において、世界中で報告される VISA が、現在以上の高度 VCM 耐性を獲得し VRSA となり難治化する事態に備え、それらに対する治療方法の確立が必要であると考えた。

私はまず、VCM に対して高度耐性を示す株 (VRSA) を人工的に取得し、治療方法を確立する上で必要な VRSA のモデル菌株の樹立に着手した。

第二節 材料と方法

菌株と培養条件

本研究で使用した菌株のリストを Table1 に示す。東京大学医学部附属病院から臨床分離された MRSA 株 (MR1~8)、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 MSSA 株 (MS9) および実験室株である RN4220 (16) と、これらから分離した VCM 耐性株 (VR1-8, VR-MS9, VR-RN) を実験に用いた。また、別の MRSA として、東北大学医学部附属病院から臨床分離された MRSA5 株をそれぞれ T2、T3、T5、T7、T8 とし、実験に使用した (17)。他の黄色ブドウ球菌として、MSSA 株である MSSA1 (18) および Newman 株 (19) を用いた。また、hVISA および VISA として、それぞれ Mu3、Mu50 を用いた (20)。なお本研究では 37°C、48 時間後における VCM の MIC 値が 16 µg/ml 以上を示す、変異原処理により得られた高度 VCM 耐性 MRSA を、VRSA のモデル菌株として使用した。本研究では特に記載がない限り、培地は Tryptic Soy Broth (TSB, Becton, Dickinson and Company) を用い、37 °C において 150 rpm の条件において震盪培養した。

変異原処理および VCM 耐性株の分離

黄色ブドウ球菌の実験室株および臨床分離株を TSB に植菌し、一終夜震盪培養した。得られた培養液 2 µl を、0.1% の Ethyl methane sulfonate (EMS) 含有 TSB 1 ml に植菌し、12~24 時間培養した。さらに得られた培養液 50 µl を、TSB 1 ml に植菌し、12-24 時間培養した (Outgrowth)。この培養液を、96 穴丸底プレート (Corning) 内に調製した様々な濃度の VCM を含む TSB に 1000 倍希釈し、2 日間静置培養した。菌の生育が見られなかったウェルの中で、最も低い VCM 濃度を、最小発育阻止濃度 (MIC) として測定した。一般的に用いられる微量希釈法や、E-test 法による MIC 測定と区別する為に、本方法により測定した MIC 値を示す場合には、各図もしくは表に付記した説明文にその都度記載した。最大濃度の VCM を含む培地上に生育した菌懸濁液に対して、上記の EMS 処理を行い、VCM 選択を繰り返した。19~26 回の EMS 処理を繰り返した後に、

各 Outgrowth 菌液を、適当な濃度の VCM 含有 TSB 寒天培地に塗布し、シングルコロニーとして分離した。これらの株を、VR1~8、VR-MS9、および VR-RN 株と命名した。

また、同様に東北大学医学部附属病院由来の MRSA5 株に対しても、上記の VCM による選択処理を繰り返し行った。この時各株に対して、EMS 処理する群および EMS 処理しない群を設けた。EMS 処理しない群については、EMS 処理以外の操作は、上記の方法と同様に行った。

微量希釈法による MIC の測定

各種抗生物質の MIC の測定は、Hamamoto, *et al.* 2015 を参考にした (21)。簡潔に記述すると、寒天培地上で培養した各菌株のコロニーをかき取り、滅菌生理食塩水に懸濁後、 $OD_{600}=0.5$ に調整した。調整した菌液を Ca^{2+} および Mg^{2+} を加えた Mueller Hinton Broth (MHB, Becton, Dickinson and Company) に 1/400 に希釈し、96 穴丸底プレートに分注した。分注した菌液入り MHB に抗生物質を 2 倍ずつ希釈して加え、37 °C、48 時間静置培養後、各ウェル内の菌液の生育を観察した。

E-test 法による MIC の測定

E-test 法は、Walsh, *et al.* 2001 を参考にし、いくつかの改変を行なった (22)。簡潔に記述すると、各株の終夜培養液を、Mcfarland 濁度標準液番号 0.5 と同等となるように希釈し、滅菌綿棒により、 Ca^{2+} および Mg^{2+} を加えた Mueller Hinton 寒天培地に塗布した。約 5 分間、安全キャビネットの中で乾燥させた後に、VCM 及びオキサシリン (OXA) の E-test ストリップ (bioMerieux) を、加熱滅菌したピンセットを用いて寒天上に静置し、37 °C で 72 時間培養した。阻止円とストリップ上の目盛との交点から、各株に対する VCM および OXA の MIC を測定した。

Population 解析

Saito, *et al.* 2014 に従った (23)。簡潔に記述すると、Brain Heart Infusion (BHI, Becton, Dickinson and Company) 培地に植菌した各株の終夜培養液を $OD_{576}=0.3$ に希釈し、さらに適当な菌濃度になるように希釈した後に、様々な濃度の VCM を含む BHI 寒天培地に塗布した。37 °C、72 時間培養後の Colony forming units (CFU) を測定した。

第三節 結果

第一項 変異原処理と薬剤選択による高度 VCM 耐性株の分離

私はまず、メチシリン感受性の研究室株である RN4220 株に対して、変異原処理を繰り返すことによりバンコマイシン (VCM) 耐性株の取得を試みた。その結果、変異原である EMS 処理と VCM 含有培地による選択を繰り返すことにより、VCM の最小発育阻止濃度 (MIC) が徐々に増加することが明らかとなった (Fig. 1)。次に、この方法を用いて、異なる地域の病院から独立して臨床分離された MRSA から、高度 VCM 耐性株の取得を試みた。その結果、その起源に関わらず、全ての臨床分離株の VCM MIC 値が、EMS 処理/VCM 選択の回数が増加するにつれて上昇した (Fig. 1)。EMS 処理/VCM 選択の回数が 15 回を超えた時、MR1 (OXA MIC = 128 $\mu\text{g/ml}$)、MR4 (OXA MIC = 8 $\mu\text{g/ml}$)、MR5 (OXA MIC > 128 $\mu\text{g/ml}$) を除く MRSA 由来株の、 β -ラクタム系抗生物質であるオキサシリン (OXA) に対する感受性が上昇した (OXA MIC \leq 4 $\mu\text{g/ml}$)。この現象は、以前の報告によりシーソー効果 (seesaw effect) と呼ばれており(24, 25)、VCM 選択により、MRSA が本来の性質である β -ラクタム耐性を失う傾向があることを示唆している。OXA 含有の Mueller Hinton Broth にこれらの VCM 耐性株を曝したところ、私は OXA 感受性の population の中に、OXA 耐性の population が含まれていることを発見した。そこで 32~128 $\mu\text{g/ml}$ の OXA で菌液を選択した後に、再び EMS 処理/VCM 選択の操作を繰り返した。最終的に 20~25 回の EMS 処理/VCM 選択を行なった後に、シングルコロニーを分離し、VCM と OXA に対して、高度耐性を示す MRSA 由来株を取得した。これらの株に対する VCM および OXA の MIC 値を微量希釈法により測定した結果を Table 2 に示した。私は、これらの株が、VCM に対して耐性であるか否かを、E-test 法によっても検討した。その結果、本研究で取得した全ての EMS 処理後の MRSA 由来株に対する VCM の MIC が、これらの親株に比べて顕著に上昇していた (Table 2,3)。

また、取得した VR3 および VR7 の分裂時間は、親株に比べて顕著に延長していた (Table 4)。

第二項 取得した変異株の VCM 耐性の測定

以前の研究から、臨床分離 hVISA である Mu3、および VISA である Mu50 が、VCM に対して、ヘテロ耐性を示す population を含むことが報告されている (20)。そこで、私は取得した VCM 耐性株が、ヘテロな特質を示すか否かを知る目的で、新たに 6 回および 10 回 EMS 処理/VCM 選択後の MR3 (VR3-EMS6、VR3-EMS10)、MR7 (VR7-EMS6、VR7-EMS10) 由来株を分離した。これらの株を、親株 MRSA である MR3-EMS0 および MR7-EMS0 と、それぞれ 20 回もしくは 22 回 EMS 処理/VCM 選択後に分離した VR3-EMS20 および VR7-EMS22 とともに、Population 解析に供した。各株の終夜培養液を適当に希釈し、BHI 寒天培地に塗布し、72 時間培養後、出現したコロニーを数えた。その結果、VR3-EMS20 および VR7-EMS22 はそれぞれ、28、24 $\mu\text{g/ml}$ VCM 含有培地上にコロニーを形成した (Fig. 2)。各株に対する VCM の MIC 値と同様に、VR3-EMS6、VR3-EMS10、VR7-EMS6、および VR7-EMS10 は、VCM 耐性度と分裂時間において、中間の表現型を示した (Fig. 2, Table 4)。また、Mu3 および Mu50 と同様に、VR3-EMS10 および VR7-EMS10 には、VCM に対してヘテロ耐性を示す population が確認された (Fig. 2)。以上の結果は、臨床分離 MRSA 株から、複数回の EMS 処理/VCM 選択により、高度バンコマイシン耐性株 (VRSA) を取得できたことを示唆している。

第四節 考察

抗生物質の発展の歴史は、同時に薬剤耐性菌の歴史でもある。病原体は、環境に適応する進化のプロセスの一環として、薬剤耐性を獲得する潜在能力を有していると考えられる。そのため薬剤耐性メカニズムを知ることは、基礎的な進化としての側面だけではなく、新たな治療方法を確立する上で、臨床的にも重要な課題である。

本章では、VCM 感受性の RN4220、MSSA1、Newman および臨床分離 MRSA 株から、VRSA を含む高度 VCM 耐性黄色ブドウ球菌の取得を試みた。その結果、*in vitro* において EMS 処理/薬剤選択を繰り返すという人工的な条件により、高度 VCM 耐性黄色ブドウ球菌を複数株取得した (Fig. 1A, B)。これまでの研究では、MRSA 株から人工的な処理によって得られた多くの VCM 耐性株が、その過程で MRSA としての特性を失い、OXA やその他の β -ラクタム系抗生物質に対する耐性を失った (シーソー効果、(24, 25))。シーソー効果の詳細なメカニズムは不明であるが、本研究においても、EMS 処理/VCM 選択を繰り返すことで、MRSA 由来株の中に、OXA MIC の低下を示す株が確認された。私は、VCM と β -ラクタム系抗生物質の両方に高度耐性を示す株が真に臨床上問題となりうると考え、本章でその取得を試みた。私の知る限りにおいて本研究は、複数の遺伝的背景を有する VCM 感受性の MRSA から、変異原処理と薬剤選択により、VCM と β -ラクタム系抗生物質 (OXA) に対してともに高度耐性を示す株を取得した初めての例である。

本研究では、EMS 処理のような特別な条件を用いたが、宿主体内においてもバクテリアは、絶えず抗生物質、宿主の免疫システム、および種々のストレス (酸化ストレスなど) に曝されている。これらの攻撃により、宿主内においても、菌の遺伝子への変異の導入とそれに伴う薬剤抵抗性の獲得が促進されるのではないかと私は考えている。

また、T7 株では、EMS 処理なしでも、VCM 選択のプロセスのみを繰り返すことにより、VCM MIC の上昇が観察された (Fig. 1C)。この株は、遺伝子修復系の欠損などの理由により、通常の株に比べて遺伝子変異が蓄積しやすくなっていることが予測される。このように、もともと遺伝子変異を増幅させるような変異株である MRSA が感染した

場合には、治療に使用する VCM に対して、通常の株に比べて容易に高い耐性を獲得することが予測される。これまでの研究により実際に、DNA 修復系の遺伝子である *mutS* を欠損させた黄色ブドウ球菌からは、遺伝子変異の導入率の上昇により、VCM 耐性度が上昇した株が得られることが報告されている (26)。

これらのことから、変異誘導剤である EMS 処理と薬剤選択を繰り返して取得した高度 VCM 耐性株は、臨床で出現しうる VRSA を模擬できており、モデル菌株として使用できると判断した。

第二章

VRSA の高度バンコマイシン耐性機構の解明

第一節 緒言

バンコマイシン中程度耐性黄色ブドウ球菌 (VISA) の出現が世界中で報告されており、これらの株がさらに高度 VCM 耐性化し、人類の脅威になることが危惧される。

これまでの研究から VISA に特徴的な表現型として、細胞壁の肥厚 (27) や、ペプチドグリカンの autolysis (分解) の低下 (25)、分裂速度の低下 (27) などが報告されている。また、ゲノム DNA 上に遺伝子変異が蓄積しており、*rpoB* (RNA ポリメラーゼのサブユニット) (15)、*pp2c* (プロテインホスファターゼ) (28)、*graRS*、*walkR*、および *vraSR* (二成分制御系) (29, 30, 31, 32) などの複数の遺伝子変異が存在することが報告されている。

ここに示した遺伝子変異のいくつかは、VCM 中程度耐性を獲得するのに重要な変異であることが示唆されている (15, 33)。しかしながら、臨床において 16 µg/ml 以上の VCM MIC を示す株が出現することは滅多にないため、これ以上の高度 VCM 耐性化を導くために、どのような遺伝子変異が新たに必要であるかについては、不明である。

私は、本研究で取得した高度 VCM 耐性株のゲノム上には、多数の遺伝子変異が蓄積していることが予測されるため、これらの株が今後出現することが危惧される臨床 VISA 由来の高度 VCM 耐性株のモデルとして利用できると判断した。

そこで私は、高度 VCM 耐性化のメカニズムを知る目的で、分離した複数の高度 VCM 耐性株の表現型解析およびゲノム解析を行った。

表現型解析としては、各親株およびそれら由来の高度 VCM 耐性株の、各種抗 MRSA 薬に対する感受性および透過型電子顕微鏡下における細胞壁の厚さを測定した。

また、本研究により分離した複数の高度 VCM 耐性株の全ゲノム配列を次世代シーケンサーにより解読し、親株と比較することで、高度 VCM 耐性株に共通して変異が導入されている遺伝子の探索を行った。

第二節 材料と方法

菌株と培養条件

本研究で使用した菌株のリストを Table1 に示した。菌株の培養方法は、前章の方法に従った。

微量希釈法による MIC の測定

本論文の前章の方法に従った。

Population 解析

本論文の前章の方法に従った。

透過型電子顕微鏡観察による細胞壁の厚さの測定

透過型電子顕微鏡による観察のためのサンプル調製を以下の通りに行った。各株を BHI 培地に植菌し、終夜震盪培養した。得られた培養液を、BHI 培地に 200 倍希釈し、OD₆₀₀ が 0.6~0.8 になるまで培養した。菌液 2 ml を急冷後 2 分間氷上に静置した後に、10000 rpm、3 分間遠心し、集めたペレットを滅菌生理食塩水で 2 回洗浄した。2 % グルタルアルデヒド (Electron Microscopy Science) 500 μ l に菌を溶解し、4 °C において、一晚回転ローターを用いて緩やかに上下震盪を行なった。調製したサンプルを Matsuo, *et al.* 2013 に従い、透過型電子顕微鏡下で観察し、細胞壁の厚さを測定した (33)。

全ゲノム配列の解析

各株のゲノム DNA は、終夜培養菌液 300 μ l を 250 μ g/ml のリゾスタフィンで 37 °C、30 分間処理した後に、QIAamp DNA Blood Mini kit (QIAGEN) を用いて抽出した。次世代シーケンサーによる全ゲノム配列の解読は、Saito, *et al.* 2014 に従った (23)。Miseq sequencing platform (Illumina) を用いて、臨床分離 MRSA 由来の 7 セット (MR/VR1, 2, 3, 4, 5, 7, 8) および RN4220 由来株の 1 セット (RN4220/VR-RN) に対して 250-bp

paired-end read シークエンスを行った。全ゲノム配列の比較は、CLC Genomic Workbench 7.5 (CLC bio) を使用し、以下の通りに行った。まず、各 MRSA の対ゲノム配列を Center of Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org>) が提供している Multi-locus sequence typing (MLST) 解析プログラムに供した。その結果、5 株 (MR1, 3, 5, 7, 8) が ST5 に、2 株 (MR2, 4) が ST8 に分類された。全ゲノム配列が公開されている株の中で、N315 (NC_002745.2) および USA300_FPR3757 (NC_007793.1) が、ST5 および ST8 の代表的な株であるため、これらの株をリファレンスゲノムとして用いた。次に各株のセット間に存在するコーディング領域内の非同義塩基置換を抽出した。

第三節 結果

第一項 VCM 耐性 MRSA の他の抗生物質への感受性試験

私は、VRSA である VR3 および VR7 の、臨床で実際に使用されている抗 MRSA 薬 (アルベカシン, ABK; リネゾリド, LNZ; ダプトマイシン, DAP; ゲンタマイシン, GTM; リファンピシン, RFP) および私の所属する研究室で発見した新規抗生物質 ライソシン E (LYE) (21) に対する感受性試験を行った。その結果、VR7 に対する ABK、DAP の MIC が上昇した以外は、親株と同等の抗生物質感受性を示した (Table 5)。このことから、EMS 処理/VCM 選択を繰り返した結果得られた VRSA の VCM 耐性は、非特異的な多剤耐性機構にはよらないことが示唆された。

第二項 透過型電子顕微鏡による VRSA の細胞壁の観察

以前の研究から、VISA の共通の特徴として、細胞壁の肥厚が報告されている (27)。そこで私は、本研究で取得した VRSA が細胞壁の肥厚を獲得することで、VCM に対して高度耐性化しているのではないかと考え、MR3、MR7 由来株について、透過型電子顕微鏡による細胞壁の観察を行なった。その結果、親株 MR3-EMS0 および MR7-EMS0 の細胞壁は表面が滑らかな構造をしており、その厚さはそれぞれ 28.9 ± 2.2 nm および 23.5 ± 2.5 nm であった (Fig. 3)。一方、VCM 耐性株では、その細胞表面は粗く、毛羽立った様な構造をしており、EMS 処理/VCM 選択の回数が増加する毎に、細胞壁の肥厚が観察された (Fig. 3)。VR3-EMS20 および VR7-EMS22 の細胞壁の厚さはそれぞれ 51.5 ± 5.4 nm および 46.6 ± 3.9 nm であり、これはそれぞれ親株の約 1.8 および 2.0 倍であった (Fig. 3)。以上の結果は、遺伝子変異の蓄積により、細胞壁の肥厚を伴った VCM 耐性化が導かれることを示唆している。

第三項 高度バンコマイシン耐性株の遺伝子変異の同定

次に私は、分離した VCM 耐性株の遺伝的な特徴を調べる目的で、次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を行なった。7セットの MRSA 由来株 (MR/VR1, 2, 3, 4, 5, 7, 8) および RN4220 由来株 (RN4220/VR-RN) について全ゲノム解析を行なった。まず、各親株 MRSA の Multi-locus sequence type を決定し、5 株 (MR1, 3, 5, 7, 8) を ST5 に、2 株 (MR2, 4) を ST8 に分類した。ゲノム解析が行なわれている株の中で、N315 株および USA300 株が、それぞれ代表的な ST5 および ST8 に分類される株であるため、これらの株をリファレンスゲノムとして使用した。各株の全ゲノム配列をリファレンスゲノムと比較し、親株とそれらから取得した VCM 耐性株のゲノム中の、コーディング領域の非同義塩基置換を抽出した。各 VCM 耐性株と親株の比較をしたところ、50~172 個の遺伝子に変異が確認された。この結果は、各 EMS 処理/VCM 選択の段階ごとに、平均 2~7 個の変異がコーディング領域に導入されることを示唆している。SA0615 (*graS*) には、8 株中 5 株で変異が認められた (Table 6)。また、これまでの研究から、VCM 耐性への寄与が報告されている SA0500 (*rpoB*) および SA0501 (*rpoC*) を含む 7 遺伝子に、8 株中 4 株で変異が見られた (15, 33, 23)。さらに私は VCM 耐性度が特に高かった 4 株の VCM 耐性株 (VCM MIC=32 µg/ml; VR3, 4, 7, VR-RN) に共通して変異が導入されていた遺伝子に着目した。その結果、SA0173 (*ausA*)、SA0519 (*sdrC*)、および SA1584 の 3 遺伝子に、4 株中 3 株で変異が確認された。これら 3 遺伝子と VCM 耐性との関連はこれまでに報告がなく、新たな VCM 耐性遺伝子の候補として本研究により見出された。また、VCM 耐性との関連の報告がある *walk* や *graS* を含む 17 遺伝子に、4 株中 2 株で変異が導入されていた (29, 30, 34, 35)。

次に私は、MR3 および MR7 由来の 2 株の高度 VCM 耐性株に着目し、さらなる全ゲノム解析を行った。MR3 および MR7 由来株について、EMS 処理/VCM 選択の回数毎にシングルコロニーを分離し、それぞれ 14 株 (VR3-EMS3~VR3-EMS16) および 16 株 (VR7-EMS3~VR7-EMS18) の全ゲノム配列を親株と比較し、遺伝子変異の数を測定した。その結果、MR3、MR7 由来株ともに、非同義変異の数と VCM MIC 値との間に、相関

係数 R^2 値がそれぞれ 0.96、0.92 という高い相関が見られた (Fig. 4)。これらの結果は、遺伝子変異の数が、VCM MIC の上昇に正の相関を有することを示唆している。

第四節 考察

本章では、取得した複数の VRSA 株を用いて、その VCM 耐性機構を知る目的で、VRSA の表現型およびゲノム解析を行った。

前章により取得した MRSA 由来の VCM 耐性株は、VCM と OXA に対して高度な耐性を示した一方で、LNZ、RFP や新規抗生物質ライソシン E などの様々な作用機序を有する他の抗生物質に対しては、感受性を示した (Table 5)。このことは、取得した VCM 耐性株の VCM 耐性機構が、VCM に特異的であることを示唆している。また VR7 は、親株である MR7 に比べて DAP に対して耐性であった。このような VCM 耐性と DAP 耐性の連関は、これまでに複数の VISA において報告されており (31, 36)、VRSA が VISA と類似した表現型を共有していることが示唆される。取得した VR3、7 の細胞壁は、それぞれの親株 MRSA に比べて、それぞれ約 1.8、2.0 倍に肥厚していた (Fig. 3)。これは、VISA の細胞壁が肥厚していることと一致している (27)。さらに、VR3 および VR7 の細胞表層には、毛羽立ったような構造が頻繁に見られた。このように、VRSA 株では、細胞の表面構造の物理的な変化、および細胞壁内部のペプチドグリカンの量や質に変化が生じることで、VCM に対して高度な耐性を示すと私は考えている。

最近、Berscheid などにより、実験的に VCM 耐性株を取得する方法が報告された。著者らは、DNA 修復系の遺伝子である *mutS* を欠損させた RN4220 株を作製した。この欠損株を継代し続けることで VCM 耐性株を取得し、*vraS* 遺伝子への変異の導入が、VISA の表現型に関わることを示した (26)。VCM に対して高度な耐性を導くゲノム上の変異は、分かっていない。高度 VCM 耐性を導くプロセスを解明する目的で、私は 8 株の VCM 耐性株の全ゲノム解読を行った。その中で、特に VCM 耐性度の高かった 4 株の高度 VCM 耐性株を高度 VCM MIC 群とし、この群の中でさらなる変異箇所の比較を行った。4 株の変異遺伝子は完全には重なっておらず、VCM 耐性を導く遺伝的なメカニズムは同一ではないことが示唆される。EMS 処理/VCM 選択を繰り返す中で、顕著に MIC 値が上昇する重要なステップがほとんど無く (Fig. 1)、遺伝子変異の数が、VCM MIC 値と正に相関することからも (Fig. 4)、ほとんどの遺伝子変異は、VCM 耐性に大きな影

響を及ぼしていないと考えられる。EMS 処理/VCM 選択の繰り返しにより、VCM 存在下において生存に必須な遺伝子変異が固定され、それらのコンビネーションが構築されることで、より高い濃度の VCM に対して耐性を獲得すると推察される。

SA1678 (*perR*) 遺伝子中の変異 (H134Y) が、2 株の高度 MIC 株 (VR3、VR7) に共通して存在する以外には、残りの変異箇所は株間で異なっていた。変異箇所は同一ではないものの、複数の株間には同じ遺伝子の変異が確認された (Table 6)。共通して変異が確認された遺伝子のいくつかは、これまでの研究から VCM 耐性との関連が報告されている (33)。このことから私は、様々な変異が、その遺伝子産物に対して類似した影響 (コンフォメーション変化、酵素活性の変化) を及ぼし、VCM 耐性を引き起こす可能性があると考えている。

私は、4 株の高度 VCM MIC 株中、3 株に変異が導入されていた遺伝子として、*ausA*、*sdrC*、SA1584 を同定した (Table 6)。これらの遺伝子は、一部が病原性因子として報告があるものの、VCM 耐性との関連はこれまでに報告されていない。一番目の *ausA* 遺伝子産物は、黄色ブドウ球菌のペプチド二次代謝産物である aureusimine の産生に関与しており、黄色ブドウ球菌の病原性への関与の有無についての報告がなされているのみである (37, 38)。他の未解明の遺伝子機能が変化することで、VCM 耐性化を導く可能性がある。二番目の *sdrC* 遺伝子は、細菌表層の付着因子をコードしており、病原性への関与が示唆されている (39)。私は、*sdrC* 遺伝子の 3 変異中 2 変異 (VR3: S746L、VR-RN: D821N) が繰り返し配列 (718~893 番目のアミノ酸) 中に、1 変異 (VR7: D625N) が Carboxypeptidase regulatory-like ドメイン (625~685 番目のアミノ酸) の中に存在することを見出した。細菌表層のタンパク質の変化は、VCM のターゲットへの接近に影響を及ぼすのではないかと私は考えている。三番目の遺伝子である SA1584 は、これまでに大腸菌でリン脂質のターンオーバーに関与していることが報告されており、lysophospholipase L2 をコードしていることが推測されている (40)。VCM 耐性株の細胞膜のリン脂質の構成が変化することで、VCM を含む抗生物質に対して耐性化すると考

えられる (41)。これらの遺伝子変異と VCM 耐性との直接の因果関係は、本研究においては立証できておらず、今後の課題である。

さらに私は、高度 VCM MIC 株に、VISA において報告されている *graS*、*walk*、*rpoB*、*rpoC* などのいくつかの変異遺伝子を見出した。本研究で示した VRSA の表現型の特徴は、*walk* (30) や *rpoB* (15, 23, 33) に変異が存在する VISA 株と類似している (細胞壁の肥厚、成長阻害)。VISA の表現型に關与するこれらの遺伝子に変異が導入されていることから、私は *in vitro* における変異原処理による高度 VCM 耐性株の取得が、VISA が将来高度 VCM 耐性化する一側面を示していると考えている。VR1 の *rpoB* 遺伝子中のある変異箇所 (406 番目のアルギニン) は、VISA で報告があった変異箇所と完全に一致している (33, 42) 一方で他の変異箇所は異なっていることから、高度 VCM 耐性に達するための経路は様々であることが示唆される。

VCM 耐性との関連が VISA で知られている遺伝子や、本研究で見出した未検証の遺伝子に着目し、各々の遺伝子変異と VCM 耐性との関連を詳細に解析することが、黄色ブドウ球菌が高度 VCM 耐性に達する進化的な経路の解明を目指す上で必要になるであろう。

第三章

カイコを用いた **VRSA** に対する抗生物質の併用療法の評価

第一節 緒言

バンコマイシン (VCM) は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 感染症に対して有効な抗生物質として、ヒト臨床において汎用されている。近年報告が相次ぐ VCM 耐性菌に対する治療薬として、テイコプラニン、アルベカシン、リネゾリド、ダプトマイシンが提案されているが、これらの抗菌薬に耐性となった菌株がすでに出現している (43, 44, 45, 46)。したがって、VCM 耐性菌に対する新たな治療方法の確立は、喫緊の課題である。

医薬品として十分な使用経験のある抗菌薬の併用は、個々の抗菌薬の安全性がすでに確立されており、薬剤耐性菌に対する新しい治療方法として注目されている。その例として、二種類の葉酸代謝拮抗薬であるスルファメトキサゾールとトリメトプリムの併用は、臨床で効果をあげている (47)。また VCM と β -ラクタム系抗生物質との併用により、バンコマイシン中程度耐性黄色ブドウ球菌 (VISA) に対する抗菌活性が上昇することが報告されている (48)。しかしながら、検証に用いられた VISA に対する VCM MIC 値がもともと低い (VCM MIC $\leq 8 \mu\text{g/ml}$) ため、併用効果の有無を評価するには限界があった。本研究により、臨床分離 MRSA 株から変異原処理と薬剤選択を繰り返すことにより、高度 VCM 耐性菌 (VRSA) を取得する方法を確立した (第一章)。私が分離した VRSA は、複数の遺伝子変異を蓄積しており、また細胞壁が肥厚しており、高濃度 ($\geq 16 \mu\text{g/ml}$) の VCM に対して耐性を示した (第二章)。私は、分離された VRSA は今後医療現場で問題となると危惧されている VCM 耐性菌感染症に対する有効な治療法を確立する上で有用であると考えた。これまでに VRSA に対して、VCM と β -ラクタム系抗生物質が *in vitro* において相乗効果を示すか否かについては報告がなく、また、これらの抗生物質の併用療法が治療効果を示すかについての動物個体を用いた *in vivo* での検証も行われていなかった。さらに、VRSA に対して VCM と併用して治療効果を示す新たな抗生物質の探索は行われてこなかった。

私が所属する研究室では、これまでに、ヒトに対する病原性細菌や真菌の感染症に対する治療薬の評価のためのカイコを用いた感染症モデルを確立している (49, 50, 51)。カイコ血中における半減期や蛋白結合などの体内動態に関する指標は、哺乳動物における値とよく一致している (52)。さらに、カイコ感染モデルでの抗菌薬の ED₅₀ 値は、哺乳動物で得られた値とよく一致しているという知見を得ている (51)。実際に我々の研究室では、このカイコ感染モデルを用いて、マウス感染モデルにおいても治療効果を示す新規抗生物質ライソシン E を発見した (21)。飼育にかかるコストが低く、かつ動物愛護の視点からの倫理的な問題が小さいカイコを用いた感染モデルは、感染症に対する治療薬候補化合物の *in vivo* 評価系として優れていると期待される (21)。

本章で私は、私が分離した VRSA に対して *in vitro* で相乗効果を示す VCM と他の抗生物質の併用の、カイコ感染モデルを用いた *in vivo* での治療効果の評価について検討した。

第二節 材料と方法

菌株および培養条件

本章で用いた菌株を Table 1 に示した。また、菌株の培養条件は、前章までに記した方法に従った。

各抗生物質の抗菌活性の測定

本論文の前章までに記した方法に従った。抗生物質を併用する場合には、菌液入り MHB の中に、必要な濃度の抗生物質を加えた。本章においては、MIC 値の比較において 4 倍以上の差がある場合、顕著な差があったとした。また、用いた抗生物質の中で、アンピシリン (ABPC) および D-サイクロセリン (CS) は、用時調製とした。

Population 解析

本論文の前章までに記した方法に従った。

カイコ飼育

実験に用いたカイコ幼虫は、Kaito, *et al.* 2002 を参考にし、飼育した (49)。簡潔に記述すると、愛媛蚕種株式会社から購入した英・蓉×つくば・ね品種の卵を、消毒した 27 °C のインキュベーター内で孵化させて飼育した。飼料には、日本農産工業株式会社から購入した抗生物質入りの人工飼料であるシルクメイト 2S を使用した。4 齢眠のカイコを分離し、1 終夜絶食させ、脱皮したものを 5 齢 1 日目とした。

黄色ブドウ球菌カイコ感染モデルを用いた抗生物質の治療効果の検証

カイコ感染モデルを用いた抗生物質の治療効果の検証は、Hamamoto, *et al.* 2004 を一部改変して行った (51)。5 齢 1 日目のカイコに対して、一匹当たり 1.1~1.2 g の人工飼料 (抗生物質を含まない、日本農産工業株式会社) を与え、約 20~24 時間 27 °C によって飼育した。さらに、黄色ブドウ球菌の終夜培養菌液の希釈液を 50 μ l 注射し (注射菌

量, $0.9\sim 1.1\times 10^8$ /カイコ)、引き続いて各カイコに、生理食塩水もしくは以下に示す濃度の抗生物質を 50 μ l ずつ、カイコの体液内に注射した。注射に用いた各抗生物質の濃度は、バンコマイシン (VCM); 100 μ g/ml、セフトリアキソン (CTRX); 800 μ g/ml、オキサシリン (OXA); 800 μ g/ml、D-サイクロセリン (CS); 800 μ g/ml であった。菌液および抗生物質を注射後、カイコを 37 °C のインキュベーター内で培養し、経時的にカイコの生死を観察した。また、菌液と薬剤を注射した後の経過時間とその時のカイコの生存率を prism ソフトに入力し、生存曲線を作成した。統計処理として prism による Log-rank test を使用した。さらに、菌液と薬剤を注射した後の経過時間とその時のカイコの生存率を方眼紙にプロットし作成した生存曲線をもとに、黄色ブドウ球菌感染カイコの生存率が 50%となるのに要した時間を、半数致死時間 (LT_{50}) として算出した。

第三節 結果

第一項 VCM 耐性 MRSA (VRSA) の増殖阻害に対する *in vitro* での VCM と各種 β-ラクタム系抗生物質の併用効果

本章でまず私は、私が分離した 8 株の VCM 耐性株に対して、OXA と VCM の相乗効果が見られるかを検討した。これら 8 株の VCM 耐性株に対する OXA の MIC はいずれも > 128 μg/ml であった。この MIC 値の 1/50 以下の濃度 (2 μg/ml) の OXA により、VCM 耐性株 8 株全てに対する VCM の MIC が 1/8 以下に低下した (Table 7)。従って OXA は私が分離した全ての VCM 耐性株に対して、VCM の MIC を顕著に低下させることが分かった。さらに私は、別の β-ラクタム系抗生物質であるセフトリアキソン (CTRX) について、CTRX 耐性かつ VCM 耐性株に対する VCM との相乗効果の有無を検討した。検討した 8 株の VCM 耐性株全てが CTRX 耐性 (MIC > 128 μg/ml) を示したが、4 μg/ml CTRX 存在下では、VR8 を除く 7 株において、VCM の MIC 値が顕著に低下することが分かった (Table 8)。特に VR1、VR2、VR3、VR6、VR7 に対する VCM の MIC は、1/8 に低下していた。VR8 においても、VCM の MIC 値は CTRX により、1/2 に低下した。さらに私は、種々の濃度の OXA および CTRX 存在下での VCM との相乗効果の有無を検討した。その結果、VR7 に対して、それぞれ 0.125、1 μg/ml 以上の濃度の OXA および CTRX が、VCM の MIC 値の顕著な低下をもたらすことが分かった (Fig. 5)。また、2 μg/ml の OXA の有無における Population 解析を行ったところ、OXA が存在した場合には、VR7 の VCM に対する感受性が顕著に上昇することが明らかとなった (Fig. 6)。次に私は、OXA や CTRX 以外の様々な β-ラクタム系抗生物質が、VRSA 株に対する VCM の MIC 値に及ぼす効果を検討した。まず、VR7 に対する各 β-ラクタム系抗生物質の MIC を測定した (Table 9)。次に、各 β-ラクタム系抗生物質を MIC 以下の濃度である 2 μg/ml 併用した場合の VR7 に対する VCM の MIC を測定した。その結果、検討した 9 種類いずれの β-ラクタム系抗生物質についても VR7 に対する VCM の MIC 値 (16 μg/ml) が、顕著に低下する (4~1 μg/ml) ことが分かった (Table 10)。

以上の結果は、*in vitro* において、VRSA に対して β-ラクタム系抗生物質が VCM と相

乗的に作用することを示唆している。

第二項 カイコ感染モデルを用いた、VCM と β -ラクタム系抗生物質の併用による治療効果の評価

一般に、抗菌薬の治療効果の評価には、動物実験が必要不可欠である。なぜなら、抗菌薬の体内動態の問題のために、試験管内の結果が必ずしも動物体内では反映されないからである。私はカイコ感染モデルを用いて、私が分離した VRSA 株による感染症に対する VCM と β -ラクタム系抗生物質の併用による治療効果が見られるか否かを検討した。VR7 をカイコの体液中に注射するとカイコは感染死した。この系において、VCM と OXA を併用投与した群では、VCM 単独投与群と比べ延命効果に統計的に有意な差は認められなかった (Fig 7, Table 11)。一方、VCM と CTRX を併用した場合には、VCM 単独に比べ、統計的に有意な差の延命効果が認められた (Fig7, Table 11)。なお、OXA および CTRX それぞれの単独投与による延命効果はみられなかった (Table 11)。

以上の結果は、VR7 感染カイコに対して、VCM と CTRX が相乗的に治療効果を示すことを示唆している。

第三項 VCM との併用により VCM の抗菌活性を上昇させる抗生物質の探索

次に、本研究により得られた VRSA に対して、併用により抗菌活性が上昇する新たな抗生物質の組み合わせを探索した。今回、以下の作用機序を有する抗生物質を用いた。細胞壁合成阻害剤; D-サイクロセリン、バシトラシン、ホスホマイシン、タンパク質合成阻害剤; エリスロマイシン、リンコマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、DNA ジャイレース阻害剤; レボフロキサシン、細胞膜破壊作用がある抗菌ペプチド; ナイシン。これらの、MR7 および VR7 に対する MIC 値を測定した (Table 12)。次に、これらの抗生物質を MIC 値の 1/3 以下の濃度である 20 µg/ml 併用した際の、MR7 および VR7 に対する VCM の MIC 値を測定した。その結果、D-サイクロセリン (CS) を併用した場合に、VR7 に対する VCM の MIC 値が 16 µg/ml から 4 µg/ml に低下した (Table 13)。先ほど私は VR7 株に対して OXA および CTRX が濃度依存的に VCM と併用効果を示すことを示した (Fig. 5)。そこで、CS についても VCM との併用効果が見られるか否かを検討した。各濃度の CS (0、4、8、16、32 µg/ml) を併用した場合の MR7 および VR7 に対する VCM の MIC 値を測定した。その結果、併用する CS の濃度依存的に VR7 に対する VCM MIC 値が低下した (Fig. 8)。

さらに、カイク感染モデルを用いて、VCM と CS の併用による治療活性の上昇が見られるか否かについて検討した。その結果、VR7 を感染させたカイクに対して、VCM と CS を併用投与した群には、VCM を単独投与した群に比べて統計的に有意な延命が認められた (Fig. 9)。また、VCM と CS の併用により、LT₅₀ が延長していた (Table 14)。

以上の結果は、VCM と CS が VRSA に対して、*in vitro*、*in vivo* 共に相乗的に作用することを示唆している。

第四節 考察

本章では、変異原処理により得られた高度 VCM 耐性 MRSA (VRSA) に対して β -ラクタム系抗生物質 (オキサシリン、セフトリアキソン、セファゾリン、メチシリン、アンピシリン、ベンジルペニシリン、カルベニシリン、セファレキシン、およびクロキサシリン)、および D-サイクロセリン (CS) が、*in vitro* での抗菌効果の評価系において、顕著な VCM MIC の低下を引き起こすことを明らかとした。また、VCM と CTRX および VCM と CS が、カイコを用いた *in vivo* での治療効果評価系において、相乗効果をもたらすことを見出した。一方、VCM と OXA の組み合わせは、カイコ感染モデルでは治療活性を示さなかった。これらの結果は、将来問題となることが危惧される高度 VCM 耐性 MRSA 感染症に対して、VCM と特定の抗生物質の併用療法が有効であることを示唆している。

本章では 8 株の変異原処理により得られた VRSA に対して、 β -ラクタム系抗生物質が VCM の MIC 値を顕著に低下させること並びに、カイコ感染モデルでの治療効果に対して、両者が相乗効果を示すことを明らかにした。これら 8 株の VCM 耐性株は、それぞれ異なる MRSA から独立に分離された株である。従って、 β -ラクタム系抗生物質と VCM の相乗効果は、今後出現することが危惧される VRSA 一般に対して見られるであろうと予想される。また本研究において私は VRSA に対して、VCM と併用効果を示す抗生物質として新たに CS を見出した (Table 13, Fig. 8)。黄色ブドウ球菌に対して併用効果を示す細胞壁合成阻害剤の組み合わせとしては、これまでに VCM と β -ラクタム系抗生物質、 β -ラクタム系抗生物質とバシトラシン、 β -ラクタム系抗生物質と CS が知られていた (53)。VCM と CS の併用による抗菌活性の上昇は私の知る限り、本研究が初めての報告である。

β -ラクタム系抗生物質は、黄色ブドウ球菌の Penicillin Binding Proteins (PBP) に結合し、ペプチドグリカン生合成におけるペプチド鎖の架橋構造の形成を阻害し、抗菌活性を示す (54) (Fig. 10)。MRSA は、 β -ラクタム系抗生物質に対する親和性が著しく低い

PBP2'をコードする *mecA* 遺伝子を含む SCCmec 領域をゲノム DNA 中に含んでいることが知られており、この PBP2'の発現により菌は、 β -ラクタム系抗生物質に対して耐性となる (6-8)。OXA は 0.125 $\mu\text{g/ml}$ 、CTRX は 1 $\mu\text{g/ml}$ 、という単独では抗菌効果を示さない濃度で、VRSA に対する VCM MIC の顕著な低下を引き起こす (Fig. 5)。これらの β -ラクタム系抗生物質は、VRSA の PBP2'以外の PBPs に作用して細胞壁合成に影響を及ぼしていると考えられる。VCM は伸長している GlcNAc-MurNAc 単位末端の D-Ala-D-Ala と結合してペプチドの架橋反応を阻害する (54) (Fig. 10)。よって私は、 β -ラクタム系抗生物質の PBPs への作用が、VRSA の細胞壁を薄くするなどの構造変化をもたらした結果、VCM が効果的に作用できるようになり、VRSA の生育を止めると考えている。 β -ラクタム系抗生物質が、VRSA の細胞壁の構造を変化させた場合に、VCM が具体的にどのように抗菌活性を上昇させるのかについては、今後研究を続ける必要がある。また、CS は 2 分子の D-Ala から、D-Ala-D-Ala ジペプチドを合成する反応の阻害により、ペプチドグリカン合成における D-Ala-D-Ala の供給を阻害する (55) (Fig. 10)。私は、抗菌活性を示さない低濃度の CS が VRSA に作用して細胞壁が薄くなり、VCM の抗菌効果が増加したと考えている。VRSA に対する β -ラクタム系抗生物質や CS の影響に関する詳細な分子機構の解明は今後の研究課題である。

すでに、*in vitro* における VISA に対する抗菌活性に、VCM と β -ラクタム系抗生物質が相乗効果を示すことが指摘されている (48)。しかしながら、従来の試験に用いられている VISA の VCM に対する耐性が低いため ($\text{MIC} \leq 8 \mu\text{g/ml}$)、MIC の低下で判定される相乗効果の有無については議論が残っていた。また、動物モデルでの治療効果に対するデータは得られていなかった。私は、変異原処理により得られた VRSA に対して 9 種類の β -ラクタム系抗生物質と VCM の組み合わせが、いずれも試験管内での菌の増殖に対して明瞭な相乗効果を示すことを明らかにした。さらに私は、カイコを用いた *in vivo* の感染治療評価系においても CTRX と VCM が相乗効果をもたらすことを見出した (Fig. 7, Table 11)。一方、カイコを用いた *in vivo* での薬効評価において、OXA は VCM

との併用効果を示さなかった (Fig. 7, Table 11)。OXA はヒトにおいて、血中半減期が短く、血清タンパク質の結合率が高く、体内動態に問題があることが指摘されている (56)。OXA の血中半減期はカイコでも短いことが予測される。それが OXA と VCM による治療に対する両者の相乗効果が、カイコ感染モデルで見られない原因であると私は考えている。

また、CS は主に結核治療に用いられており (57)、黄色ブドウ球菌感染症に対して使用されることはほとんどない。しかしながら本研究により、単独投与では治療できない濃度の CS を VCM と併用することで、VR7 感染症に対して延命が認められた (Fig. 9, Table 14)。本研究から CS と VCM の併用投与が高度 VCM 耐性 MRSA 感染症に対する有効な治療法になると考えられる。CS の例が示すように、抗菌スペクトルの狭さや、薬剤耐性菌の出現などの理由により使用が控えられていた抗生物質を組み合わせる使用することにより、多剤耐性菌に対して有効な治療方法が見つかる可能性がある。

VCM と β -ラクタム系抗生物質の相乗効果は、MRSA の各種株に対してもわずかであるが見出された (Table 7, 8, 10)。いずれの MRSA も VCM に対して感受性であるため、MIC 値の低下を顕著な差として明確に判定することは困難である。しかしながら私は、現在問題となっている、MRSA の VCM 感受性に関する MIC Creep と呼ばれる現象 (58) に対して、VCM と β -ラクタム系抗生物質の併用効果の有用性を期待している。

既存薬を見直し、適用疾患を拡張させるドラッグリポジショニングが提唱されている (59)。私は、このドラッグリポジショニングの考え方を元に、耐性菌などの出現で使用が不適当であると判定された抗菌治療薬を併用することにより再利用するという”ドラッグリユース (Drug reuse)”という新たなコンセプトを提案する。すでに安全性や体内動態の問題がないことが立証されている抗菌治療薬の組み合わせによる治療法の確立は、急速に出現する薬剤耐性菌感染症を低コストでしかも迅速に克服する上で有用であると考えられる。

第四章

総括と今後の展望

本研究の成果を以下にまとめる。

- 1) *In vitro* の変異原処理と薬剤選択により複数の臨床分離 MRSA から、将来の流行が危惧される高度バンコマイシン耐性 MRSA (VRSA) のモデル菌株を樹立した。
- 2) 取得した高度バンコマイシン耐性 MRSA は、ゲノム上に新規 VCM 耐性遺伝子の候補を含む複数の遺伝子変異が蓄積しており、細胞壁の肥厚を伴う高度バンコマイシン耐性を獲得していることが示唆された。
- 3) 高度バンコマイシン耐性 MRSA に対する新規治療方法として、バンコマイシンとセフトリアキソン、およびバンコマイシンと D-サイクロセリンの併用療法が有効であることが示唆された。

Fig. 11 に、本研究から得られた VRSA 感染症に対する治療戦略をモデル図として示した。

以下に、私が考える今後の展望を述べる。

1) VCM と β -ラクタム系抗生物質の併用効果の分子メカニズムの解明

私は、本研究において高度 VCM 耐性 MRSA に対してある種の抗生物質の併用により、抗菌活性ならびに治療活性の上昇が見られることに大変興味を持った。そこで、見出した VCM と β -ラクタム系抗生物質の併用効果の詳細な分子メカニズムを解明したいと考えている。

本研究で取得した高度 VCM 耐性 MRSA およびその親株の MRSA は、遺伝学的な実験操作に適しておらず、ファージによる遺伝子導入や、プラスミドの形質転換実験が困難であり、薬剤耐性遺伝子を同定する上で非常に不利となる。私は、高度 VCM 耐性 MRSA と共に、遺伝子操作が容易な実験室株である RN4220 由来の高度 VCM 耐性株 (VR-RN) も樹立している。また私は、VR-RN 株へのプラスミド DNA の形質転換が可

能であることをすでに確かめている。現在、予備的な段階ではあるが、VR-RN 株を使用した VCM と β -ラクタム系抗生物質の作用メカニズムを解明する研究を始めている。

VR-RN 株に対して、VCM と sub-MIC (MIC の 1/2 の濃度) の OXA を同時に作用させたところ、VR-RN に対する VCM MIC が低下した。私は、VR-RN 株をさらに適当な濃度の VCM と OXA で選択したところ、VR-RN 株に比べて、VCM と OXA の同時曝露に対して耐性を示す株を分離することに成功した。私は、この株の全ゲノム配列を解読し、VR-RN 株と比較することで、VCM と β -ラクタム系抗生物質の併用効果に対する耐性に寄与する遺伝子変異を同定でき、併用の作用メカニズムに迫れるのではないかと考えている。

2)薬剤耐性菌に対して有効な抗生物質の組み合わせの探索

本研究において私は、VRSA に対して有効な抗生物質の組み合わせとして、VCM と相乗効果を示す抗生物質の探索を行った。現在、グラム陽性菌の細胞壁合成を阻害する抗生物質として、VCM、 β -ラクタム系抗生物質、CS、バシトラシン、およびホスホマイシンが存在している。これら 5 種類の抗生物質の中から 2 つを選び、片方の抗生物質の MIC の 1/4 の濃度を併用した場合の、VR7 に対する、もう片方の抗生物質の MIC を測定したところ、予備的な結果ながら、以下の組み合わせ併用した場合に、顕著な抗菌活性の上昇が見られた。

- VCM と β -ラクタム系抗生物質 (セファゾリン)
- VCM と D-サイクロセリン
- β -ラクタム系抗生物質 (セファゾリン) と D-サイクロセリン
- β -ラクタム系抗生物質 (セファゾリン) とバシトラシン

本研究では、この中で特に、VCM と β -ラクタム系抗生物質、および VCM と D-サイクロセリンの併用の有効性を検証した。上記の予備的な実験から、 β -ラクタム系抗生物質と D-サイクロセリンにも併用効果が見られた。これら三薬は、全て D-Ala-D-Ala ジ

ペプチドを介したペプチド架橋反応の阻害に関与している (Fig. 10)。そのため、VCM- β -ラクタム系抗生物質-D-サイクロセリンの三剤併用により、より高い抗菌活性および治療活性が得られるのではないかと私は考えている。今後 *in vitro* の系およびカイコを用いた *in vivo* の系により、三剤併用の効果を評価していきたいと計画している。

また、VCM や β -ラクタム薬だけでなく、細菌の DNA 複製、転写、翻訳反応を阻害するなどの様々な作用機序を有する抗生物質を複数組み合わせることで、MRSA や VRSA だけでなく、同様に臨床上の問題となっている多剤耐性緑膿菌などの感染症に対して有効な治療方法が、より迅速に見出せるのではないかと私は期待している。

参考文献

1. Darwin C (1859) *On the Origin of Species by Means of Natural Selection or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life* (John Murray).
2. Fleming A (1929) On the Antibacterial Action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B.influenzae*.
3. Rammelkamp CH & Maxon T (1942) Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin. *Experimental Biology and Medicine* 51(3):386-389.
4. Kirby WM (1944) Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science* 99(2579):452-453.
5. Parker M & Jevons MP (1964) A survey of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Postgraduate medical journal* 40(Suppl):170.
6. Katayama Y, Ito T, & Hiramatsu K (2000) A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. (Translated from eng) *Antimicrob Agents Chemother* 44(6):1549-1555 (in eng).
7. Hartman BJ & Tomasz A (1984) Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. (Translated from eng) *J Bacteriol* 158(2):513-516 (in eng).
8. Ubukata K, Nonoguchi R, Matsushashi M, & Konno M (1989) Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. (Translated from eng) *J Bacteriol* 171(5):2882-2885 (in eng).
9. Merlino J, *et al.* (2002) Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non-multidrug-resistant *Staphylococcus*

- aureus* in Central Sydney, Australia. (Translated from eng) *J Antimicrob Chemother* 49(5):793-801 (in eng).
10. Rubinstein E & Keynan Y (2014) Vancomycin revisited - 60 years later. (Translated from eng) *Front Public Health* 2:217 (in eng).
 11. CLSI (2009) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.
 12. Chang S, *et al.* (2003) Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. (Translated from eng) *N Engl J Med* 348(14):1342-1347 (in eng).
 13. Perichon B & Courvalin P (2009) VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. (Translated from eng) *Antimicrob Agents Chemother* 53(11):4580-4587 (in eng).
 14. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, & Grayson ML (2010) Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. (Translated from eng) *Clin Microbiol Rev* 23(1):99-139 (in eng).
 15. Matsuo M, *et al.* (2011) Mutation of RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) promotes hVISA-to-VISA phenotypic conversion of strain Mu3. (Translated from eng) *Antimicrob Agents Chemother* 55(9):4188-4195 (in eng).
 16. Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J, & Schlievert P (1988) Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. (Translated from eng) *J Bacteriol* 170(9):4365-4372 (in eng).
 17. Aoyagi T, *et al.* (2014) Impact of *psm-mec* in the mobile genetic element on the clinical characteristics and outcome of SCCmec-II methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus* bacteraemia in Japan. (Translated from eng) *Clin Microbiol Infect* 20(9):912-919 (in eng).
18. Akimitsu N, *et al.* (1999) Increase in resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to beta-lactams caused by mutations conferring resistance to benzalkonium chloride, a disinfectant widely used in hospitals. (Translated from eng) *Antimicrob Agents Chemother* 43(12):3042-3043 (in eng).
 19. Duthie ES & Lorenz LL (1952) Staphylococcal coagulase; mode of action and antigenicity. (Translated from eng) *J Gen Microbiol* 6(1-2):95-107 (in eng).
 20. Hiramatsu K, *et al.* (1997) Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. (Translated from eng) *Lancet* 350(9092):1670-1673 (in eng).
 21. Hamamoto H, *et al.* (2015) Lysocin E is a new antibiotic that targets menaquinone in the bacterial membrane. (Translated from eng) *Nat Chem Biol* 11(2):127-133 (in eng).
 22. Walsh TR, *et al.* (2001) Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. (Translated from eng) *J Clin Microbiol* 39(7):2439-2444 (in eng).
 23. Saito M, *et al.* (2014) "Slow VISA," a novel phenotype of vancomycin resistance, found *in vitro* in heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strain Mu3. (Translated from eng) *Antimicrob Agents Chemother* 58(9):5024-5035 (in eng).
 24. Sieradzki K & Tomasz A (1996) A highly vancomycin-resistant laboratory mutant of *Staphylococcus aureus*. (Translated from eng) *FEMS Microbiol Lett* 142(2-3):161-166 (in eng).

25. Sieradzki K & Tomasz A (1997) Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*. (Translated from eng) *J Bacteriol* 179(8):2557-2566 (in eng).
26. Berscheid A, *et al.* (2014) Generation of a vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) strain by two amino acid exchanges in VraS. (Translated from eng) *J Antimicrob Chemother* 69(12):3190-3198 (in eng).
27. Cui L, *et al.* (2003) Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. (Translated from eng) *J Clin Microbiol* 41(1):5-14 (in eng).
28. Passalacqua KD, Satola SW, Crispell EK, & Read TD (2012) A mutation in the PP2C phosphatase gene in a *Staphylococcus aureus* USA300 clinical isolate with reduced susceptibility to vancomycin and daptomycin. (Translated from eng) *Antimicrob Agents Chemother* 56(10):5212-5223 (in eng).
29. Cui L, Neoh HM, Shoji M, & Hiramatsu K (2009) Contribution of *vraSR* and *graSR* point mutations to vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. (Translated from eng) *Antimicrob Agents Chemother* 53(3):1231-1234 (in eng).
30. Shoji M, *et al.* (2011) *walk* and *clpP* mutations confer reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. (Translated from eng) *Antimicrob Agents Chemother* 55(8):3870-3881 (in eng).
31. Howden BP, *et al.* (2008) Genomic analysis reveals a point mutation in the two-component sensor gene *graS* that leads to intermediate vancomycin resistance in clinical *Staphylococcus aureus*. (Translated from eng) *Antimicrob Agents Chemother* 52(10):3755-3762 (in eng).
32. Howden BP, *et al.* (2011) Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two

- component regulator WalkR. (Translated from eng) *PLoS Pathog* 7(11):e1002359 (in eng).
33. Matsuo M, Cui L, Kim J, & Hiramatsu K (2013) Comprehensive identification of mutations responsible for heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA)-to-VISA conversion in laboratory-generated VISA strains derived from hVISA clinical strain Mu3. (Translated from eng) *Antimicrob Agents Chemother* 57(12):5843-5853 (in eng).
 34. Neoh HM, *et al.* (2008) Mutated response regulator *graR* is responsible for phenotypic conversion of *Staphylococcus aureus* from heterogeneous vancomycin-intermediate resistance to vancomycin-intermediate resistance. (Translated from eng) *Antimicrob Agents Chemother* 52(1):45-53 (in eng).
 35. Finan JE, Archer GL, Pucci MJ, & Climo MW (2001) Role of penicillin-binding protein 4 in expression of vancomycin resistance among clinical isolates of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. (Translated from eng) *Antimicrob Agents Chemother* 45(11):3070-3075 (in eng).
 36. Cui L, Tominaga E, Neoh HM, & Hiramatsu K (2006) Correlation between Reduced Daptomycin Susceptibility and Vancomycin Resistance in Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. (Translated from eng) *Antimicrob Agents Chemother* 50(3):1079-1082 (in eng).
 37. Wyatt MA, *et al.* (2010) *Staphylococcus aureus* nonribosomal peptide secondary metabolites regulate virulence. (Translated from eng) *Science* 329(5989):294-296 (in eng).
 38. Sun F, *et al.* (2010) Aureusimines in *Staphylococcus aureus* are not involved in virulence. (Translated from eng) *PLoS One* 5(12):e15703 (in eng).

39. Corrigan RM, Miajlovic H, & Foster TJ (2009) Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. (Translated from eng) *BMC Microbiol* 9:22 (in eng).
40. Hsu L, Jackowski S, & Rock CO (1991) Isolation and characterization of *Escherichia coli* K-12 mutants lacking both 2-acyl-glycerophosphoethanolamine acyltransferase and acyl-acyl carrier protein synthetase activity. (Translated from eng) *J Biol Chem* 266(21):13783-13788 (in eng).
41. Nishi H, Komatsuzawa H, Fujiwara T, McCallum N, & Sugai M (2004) Reduced content of lysyl-phosphatidylglycerol in the cytoplasmic membrane affects susceptibility to moenomycin, as well as vancomycin, gentamicin, and antimicrobial peptides, in *Staphylococcus aureus*. (Translated from eng) *Antimicrob Agents Chemother* 48(12):4800-4807 (in eng).
42. Alam MT, et al. (2014) Dissecting vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus* using genome-wide association. (Translated from eng) *Genome Biol Evol* 6(5):1174-1185 (in eng).
43. Robert J, Bismuth R, & Jarlier V (2006) Decreased susceptibility to glycopeptides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a 20 year study in a large French teaching hospital, 1983-2002. (Translated from eng) *J Antimicrob Chemother* 57(3):506-510 (in eng).
44. Ishino K, Ishikawa J, Ikeda Y, & Hotta K (2004) Characterization of a bifunctional aminoglycoside-modifying enzyme with novel substrate specificity and its gene from a clinical isolate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with high arbekacin resistance. (Translated from eng) *J Antibiot (Tokyo)* 57(10):679-686 (in eng).

45. Wilson P, *et al.* (2003) Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. (Translated from eng) *J Antimicrob Chemother* 51(1):186-188 (in eng).
46. Mehta S, *et al.* (2012) VraSR two-component regulatory system contributes to *mprF*-mediated decreased susceptibility to daptomycin in *in vivo*-selected clinical strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. (Translated from eng) *Antimicrob Agents Chemother* 56(1):92-102 (in eng).
47. Bushby SR & Hitchings GH (1968) Trimethoprim, a sulphonamide potentiator. (Translated from eng) *Br J Pharmacol Chemother* 33(1):72-90 (in eng).
48. Werth BJ, *et al.* (2013) Novel combinations of vancomycin plus ceftaroline or oxacillin against methicillin-resistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous VISA. (Translated from eng) *Antimicrob Agents Chemother* 57(5):2376-2379 (in eng).
49. Kaito C, Akimitsu N, Watanabe H, & Sekimizu K (2002) Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans. (Translated from eng) *Microb Pathog* 32(4):183-190 (in eng).
50. Matsumoto Y, *et al.* (2012) Quantitative evaluation of cryptococcal pathogenesis and antifungal drugs using a silkworm infection model with *Cryptococcus neoformans*. (Translated from eng) *J Appl Microbiol* 112(1):138-146 (in eng).
51. Hamamoto H, *et al.* (2004) Quantitative evaluation of the therapeutic effects of antibiotics using silkworms infected with human pathogenic microorganisms. (Translated from eng) *Antimicrob Agents Chemother* 48(3):774-779 (in eng).
52. Fujiyuki T, Imamura K, Hamamoto H, & Sekimizu K (2010) Evaluation of therapeutic effects and pharmacokinetics of antibacterial chromogenic agents in a silkworm model of *Staphylococcus aureus* infection. (Translated from eng) *Drug Discov Ther* 4(5):349-354 (in eng).

53. Komatsuzawa H, Suzuki J, Sugai M, Miyake Y, & Suginaka H (1994) Effect of combination of oxacillin and non-beta-lactam antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. (Translated from eng) *J Antimicrob Chemother* 33(6):1155-1163 (in eng).
54. Walsh C (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. (Translated from eng) *Nature* 406(6797):775-781 (in eng).
55. Prosser GA & de Carvalho LP (2013) Kinetic mechanism and inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* D-alanine:D-alanine ligase by the antibiotic D-cycloserine. (Translated from eng) *FEBS J* 280(4):1150-1166 (in eng).
56. Barza M & Weinstein L (1974) Some determinants of the distribution of penicillins and cephalosporins in the body. Practical and theoretical considerations. (Translated from eng) *Ann N Y Acad Sci* 235(0):613-620 (in eng).
57. Donald PR (2010) The chemotherapy of tuberculous meningitis in children and adults. (Translated from eng) *Tuberculosis (Edinb)* 90(6):375-392 (in eng).
58. Steinkraus G, White R, & Friedrich L (2007) Vancomycin MIC creep in non-vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), vancomycin-susceptible clinical methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) blood isolates from 2001-05. (Translated from eng) *J Antimicrob Chemother* 60(4):788-794 (in eng).
59. Ashburn TT & Thor KB (2004) Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. (Translated from eng) *Nat Rev Drug Discov* 3(8):673-683 (in eng).

図表

Strain name	Description	Reference
MR1-MR8	東京大学医学部附属病院臨床分離メチシリン耐性黄色ブドウ球菌	This study
T2, T3, T5, T7, T8	東北大学病院臨床分離メチシリン耐性黄色ブドウ球菌	17
MS9	東京大学医学部附属病院臨床分離メチシリン感受性黄色ブドウ球菌	This study
MSSA1	九州大学病院臨床分離メチシリン感受性黄色ブドウ球菌	18
Newman	臨床分離メチシリン感受性黄色ブドウ球菌	19
RN4220	メチシリン感受性黄色ブドウ球菌研究室株	16
VR1	24回EMS処理/VCM選択後に分離された、MR1由来のバンコマイシン耐性株	This study
VR2	22回EMS処理/VCM選択後に分離された、MR2由来のバンコマイシン耐性株	This study
VR3-EMS6	6回EMS処理/VCM選択後に分離された、MR3由来のバンコマイシン耐性株	This study
VR3-EMS10	10回EMS処理/VCM選択後に分離された、MR3由来のバンコマイシン耐性株	This study
VR3(-EMS20)	20回EMS処理/VCM選択後に分離された、MR3由来のバンコマイシン耐性株	This study
VR4	25回EMS処理/VCM選択後に分離された、MR4由来のバンコマイシン耐性株	This study
VS5	25回EMS処理/VCM選択後に分離された、MR5由来のバンコマイシン耐性株	This study
VR6	24回EMS処理/VCM選択後に分離された、MR6由来のバンコマイシン耐性株	This study
VR7-EMS6	6回EMS処理/VCM選択後に分離された、MR7由来のバンコマイシン耐性株	This study
VR7-EMS10	10回EMS処理/VCM選択後に分離された、MR7由来のバンコマイシン耐性株	This study
VR7(-EMS22)	22回EMS処理/VCM選択後に分離された、MR7由来のバンコマイシン耐性株	This study
VR8	25回EMS処理/VCM選択後に分離された、MR8由来のバンコマイシン耐性株	This study
VR-MS9	26回EMS処理/VCM選択後に分離された、MS9由来のバンコマイシン耐性株	This study
VR-RN	19回EMS処理/VCM選択後に分離された、RN4220由来のバンコマイシン耐性株	This study
Mu3	臨床分離 heterogeneous バンコマイシン中程度耐性黄色ブドウ球菌 (hVISA)	20
Mu50	臨床分離 バンコマイシン中程度耐性黄色ブドウ球菌 (VISA)	20

Table 1. 本研究で用いた黄色ブドウ球菌の菌株リスト

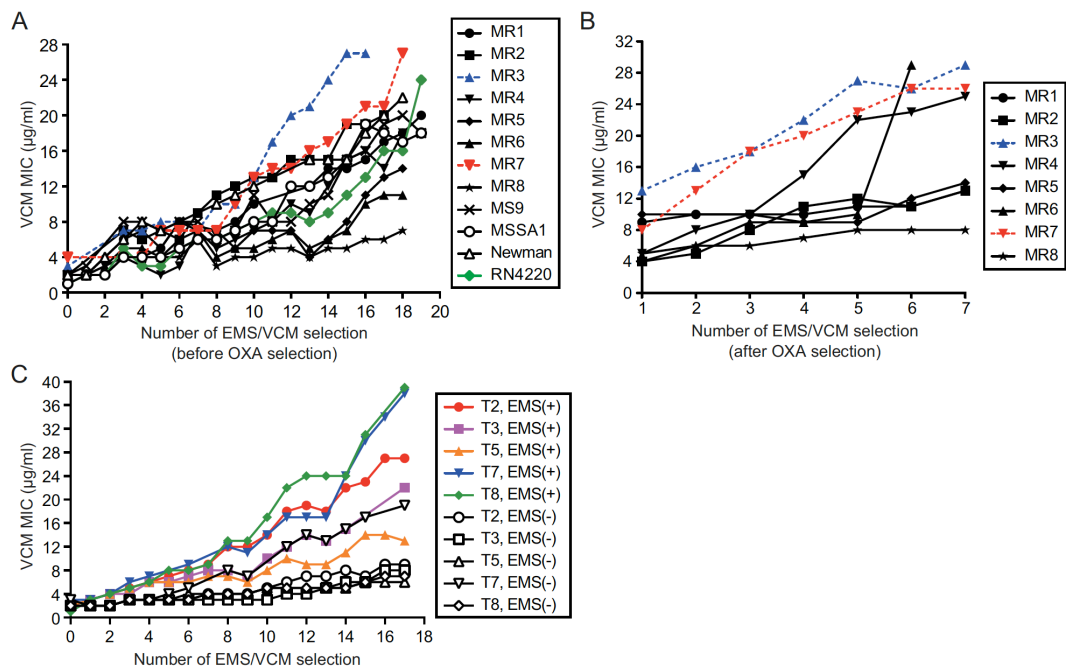


Fig. 1. EMS 変異原処理による各黄色ブドウ球菌の VCM MIC 値の上昇

A, 臨床分離株 (東大病院由来株である MR1~8 および MS9) および実験室株を 0.1 % EMS を含む培地で培養した。各終夜培養液を EMS を含まない培地へ希釈し、一晚培養後 (Outgrowth)、VCM 耐性変異株を選択した。本実験では、MIC 値を、高度 VCM 耐性株の分離について材料と方法の項で示した方法により測定した。

B, A に得られた VCM 耐性変異株の中で、MRSA 由来の株を 32~128 $\mu\text{g/ml}$ の OXA に曝露した。OXA により選択された OXA 耐性変異株に対して、改めて EMS 処理/VCM 選択を繰り返し行った。OXA 選択後の EMS 処理/VCM 選択の回数を図中の X 軸に示した。

C, 東北大学病院で臨床分離された 5 株の MRSA を 0.1% EMS 存在下 (closed symbols)、もしくは非存在下 (open symbols)において培養した。VCM 耐性変異株を A に記述した方法により選択した。

Strain	VCM	OXA	Strain	VCM	OXA
MR1	2	> 128	VR1	8	> 128
MR2	1	128	VR2	8	> 128
MR3	2	>128	VR3	32	>128
MR4	1	16	VR4	32	128
MR5	2	> 128	VR5	8	> 128
MR6	1	64	VR6	16	> 128
MR7	1	>128	VR7	32	128
MR8	1	> 128	VR8	16	> 128
MS9	1	< 2	VR-MS9	32	< 2
RN4220	< 0.5	< 2	VR-RN	32	< 2

Table 2. 親株および変異原処理により得られた株に対する VCM および OXA の MIC

各株に対する抗生物質の MIC を微量希釈法により測定した (37 °C 、 48 時間) 。

単位: $\mu\text{g/ml}$ 。

VCM, バンコマイシン; OXA, オキサシリン

Strain	VCM	OXA	Strain	VCM	OXA
MR1	1.5	> 256	VR1	8.0	> 256
MR2	2.0	> 256	VR2	12	> 256
MR3	2.0	> 256	VR3	24	> 256
MR4	1.5	3.0	VR4	32	> 256
MR5	1.5	> 256	VR5	8.0	> 256
MR6	1.5	8.0	VR6	16	> 256
MR7	1.5	> 256	VR7	16	> 256
MR8	1.5	> 256	VR8	8.0	> 256
MS9	2.0	0.50	VR-MS9	32	0.23
RN4220	1.5	0.094	VR-RN	16	0.19

Table 3. E-test により測定した VCM および OXA の MIC 値

各株に対する抗生物質の MIC を E-test 法により測定した (37 °C、72 時間)。

単位: µg/ml.

Strain	VCM MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Doubling time (min)
MR3(-EMS0)	2	34
VR3-EMS6	8	41
VR3-EMS10	16	52
VR3(-EMS20)	32	60
MR7(-EMS0)	1	27
VR7-EMS6	8	39
VR7-EMS10	16	40
VR7(-EMS22)	32	50
Mu50	8	37
RN4220	1	32

Table 4. 親株 MRSA および取得した VCM 耐性株の VCM MIC 値および分裂時間
各株に対する VCM の MIC を微量希釈法により測定した (37 °C、48 時間)。また、分裂
時間は、抗生物質を含まない培地中で 37 °C で培養後、exponential growth phase におけ
る OD₆₀₀ 値をプロットし、算出した。

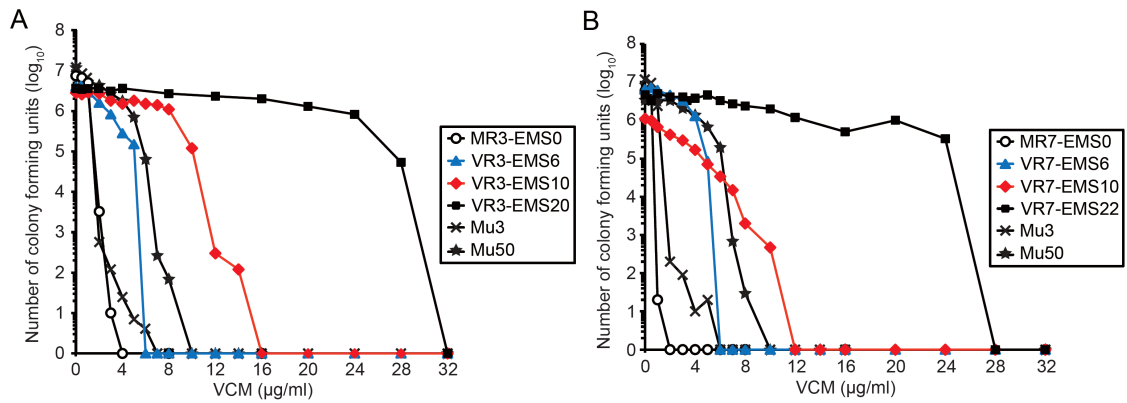


Fig. 2. VRSA の Population 解析

親株 MRSA (MR3-EMS0 (A)もしくは MR7-EMS0 (B))、6 もしくは 10 回後の EMS 処理 /VCM 選択後に分離した中間型 VCM 耐性株 (VR3-EMS6、VR3-EMS10、VR7-EMS6、VR7-EMS10)、20 回もしくは 22 回後の EMS 処理/VCM 選択後に分離した高度 VCM 耐性株 (VR3-EMS20、VR7-EMS22)、hVISA (Mu3)、および VISA (Mu50) を、BHI 培地を用いて培養した。各終夜培養液を $OD_{576}=0.3$ まで希釈し、さらに 10 倍階段希釈した後、様々な濃度の VCM を含む BHI 寒天培地上に塗布した。37 °C、72 時間培養後のコロニーをカウントした。

Strain	VCM	OXA	LYE	ABK	LNZ	DAP	GTM	RFP
MR3	2	> 128	8	2	4	0.5	1	< 0.25
VR3	32	> 128	8	1	2	1	1	< 0.25
MR7	1	> 128	8	4	4	0.5	> 16	< 0.25
VR7	32	> 128	8	16	2	8	> 16	< 0.25

Table 5. VRSA に対する各種抗生物質の MIC

各株に対する抗生物質の MIC を微量希釈法により測定した (37 °C 、 48 時間) 。

単位: $\mu\text{g/ml}$ 。

VCM, バンコマイシン; OXA, オキサシリン; LYE, ライソシン E; ABK, アルベカシン;
LNZ, リネゾリド; DAP, ダプトマイシン; GTM, ゲンタマイシン; RFP, リファンピシン

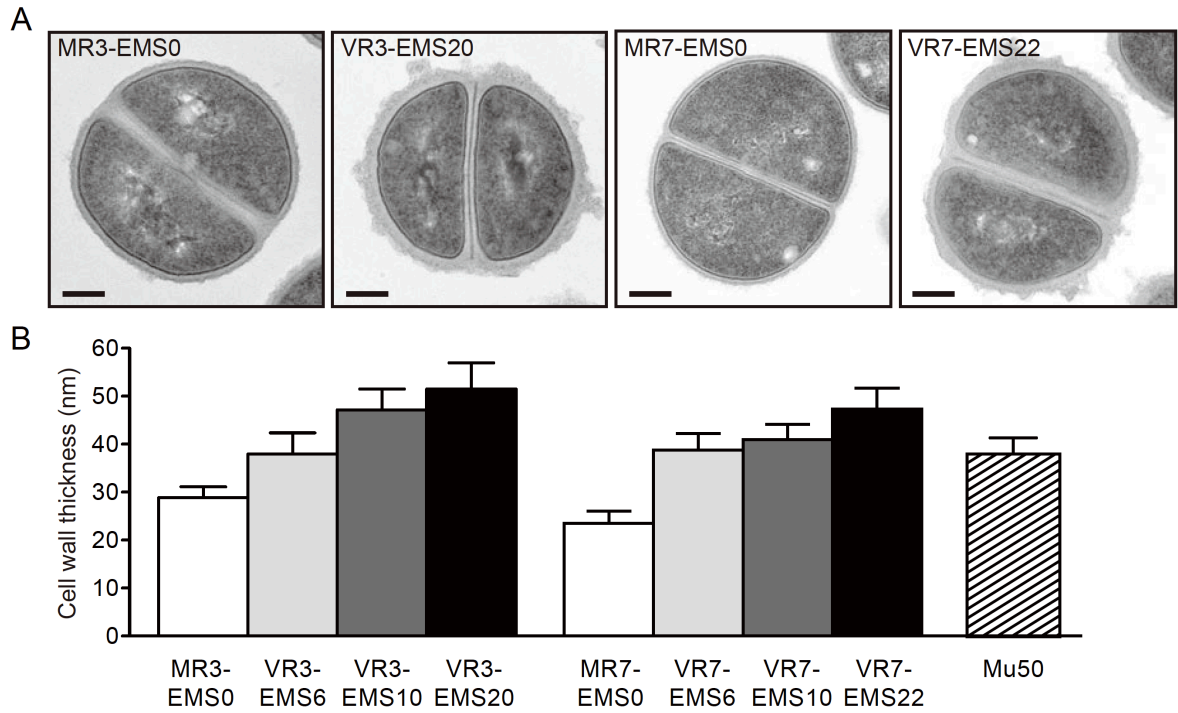


Fig. 3. 透過型電子顕微鏡による VRSA の観察

A, 各株の代表的な写真を示した。スケールバー: 200 nm。

B, 各株の細胞壁の厚さ。データは、30~41 個の細胞の平均±SD を示している。

統計的有意性は、one-way ANOVA with Tukey' s multi-comparison test により解析した。

MR3 由来株間の P 値は、全て 0.001 未満であった。また、MR7 由来株間の P 値は、

VR7-EMS6-VR7-EMS10 間が 0.05 未満である以外は全て、0.001 未満であった。

Gene	Mutated strains	VR1 (MIC=8)	VR2 (MIC=8)	VR5 (MIC=8)	VR8 (MIC=16)	VR3 (MIC=32)	VR4 (MIC=32)	VR7 (MIC=32)	VR-RN (MIC=32)
SA0615 (<i>graS</i>)	5 / 8	c38t; S13F	g469a; E157K, I880a; S294T	g839a; R280Q	-	-	-	g626a; G209D	g523a; E175K
SA0173 (<i>ausA</i>)	4 / 8	-	-	-	c2359t; R787C	c3484t; R1162C	-	g2999a; S1000N	c6847t; Q2283*
SA0500 (<i>rpoB</i>)	4 / 8	c1216t; R406C	-	-	g3466a; D1156N	c3247t; L1083F	-	g2934a; M978I	-
SA0501 (<i>rpoC</i>)	4 / 8	g1450a; D484N	↓	c1003t; R335C	-	-	-	a986g; Q329R, c3383t; T1128I	c2344t; L782F
SA1069 (<i>yleV</i>)	4 / 8	-	g50a; G17E, c1454t; T485I	-	g3a; M1Δ	g1607a; G536D	-	g135a; M45I, a851g; H284R	-
SA1267 (<i>ebhA</i>)	4 / 8	-	g26785a; A8929T, g19474a; V6492I	c2176t; Q726*	-	g16760a; G5587D	-	-	c7850t; S261F
SA1593	4 / 8	g544a; A182T	g433a; E145K	-	-	g800a; G267E	-	674-681 del-fs	-
SA1678 (<i>perR</i>)	4 / 8	g271a; D91N	-	g251a; G84E	-	c400t; H134Y	-	c400t; H134Y	-
SA0018 (<i>walK</i>)	3 / 8	-	-	-	c1745a; A582E	-	c256t; R86C, I860c; I287T	-	g1278a; M426I
SA0519 (<i>sdrC</i>)	3 / 8	-	-	-	-	c2237t; S746L	-	g1873a; D625N	2263-2268 del, g2461a; D821N
SA0878 (<i>terC</i>)	3 / 8	-	g637a; G213S	-	-	g88a; A30T	-	g633a; W211*	-
SA1118	3 / 8	g1426a; D476N	g497a; S166N	g515a; S172N	-	-	-	-	-
SA1584	3 / 8	-	-	-	-	c199t; H67Y	-	c194t; T65M	g514a; A172T

Table 6. VCM 耐性株間に共通して見られる変異遺伝子と各変異部位

3 株以上の VCM 耐性株に共通して見られる変異遺伝子を示した。各変異株の VCM MIC を株名の後ろのカッコ内に示した (単位: $\mu\text{g/ml}$)。 “Mutated strains” は、本研究で解析した 8 株中、各遺伝子に変異を有する (正確な変異部位に関わらず) 株の数を示している。 “nXm” は、コーディング領域内の変異部位を示しており、親株の ‘X’ 番目の塩基 ‘n’ が、変異株では ‘m’ に置換していることを示している。また、 “PYQ” は、 ‘Y’ 番目のアミノ酸が、 ‘P’ から ‘Q’ へ変化していることを示している。アスタリスク (*) もしくはデルタ (Δ) はそれぞれ、ストップコドンの出現もしくは消失を示している。 “X-Y del” は、親株のコーディング領域における ‘X’ 番目から ‘Y’ 番目の塩基が、変異株では除去されていることを示している。また、 “del-fs” は、フレームシフト変異の出現を示している。株名は、左から VCM MIC の低いものから示されており、各列は、白 (VCM MIC = 8 $\mu\text{g/ml}$)、薄いグレー (VCM MIC = 16 $\mu\text{g/ml}$)、もしくは濃いグレー (VCM MIC = 32 $\mu\text{g/ml}$) で分けられている。リストアップした遺伝子の中で、最も頻繁に変異が見られた遺伝子 (8 株中 5 株で変異) である SA0615 (*graS*) を赤字で示した。また、SA0173 (*ausA*)、SA0519 (*sdrC*)、および SA1584 は、4 株の高度 VCM MIC 株 (MIC = 32 $\mu\text{g/ml}$) 中 3 株で変異が見られ、表中では青字で示した。

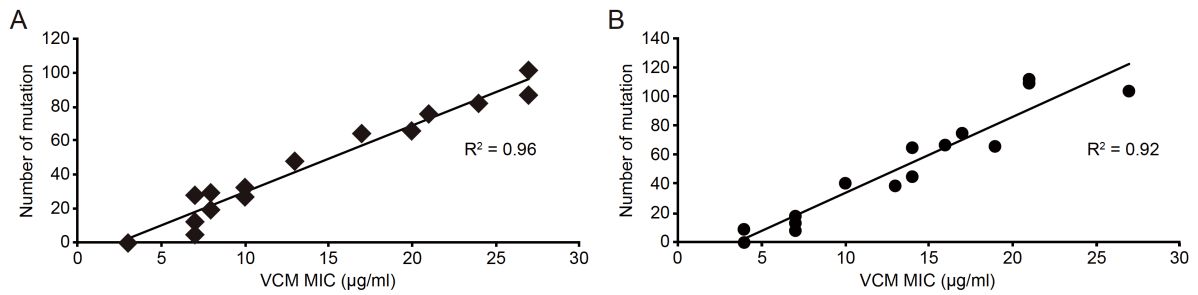


Fig. 4. VCM MIC と VCM 耐性株のゲノム上の変異の数との間の相関

EMS 処理/VCM 選択を繰り返す間に得られた中間株について、全ゲノムシーケンスを行った。MR3 由来 (A) もしくは MR7 由来株 (B) の、それぞれ 3~16 回 変異原処理 (14 株、VR3-EMS3~EMS16) もしくは 3~18 回 変異原処理 (16 株、VR7-EMS3~VR7-EMS18) 後に分離された変異株について、解析を行った。第一章の Fig1. で測定した VCM の MIC および各中間株の変異の数をプロットした。R² 値は、VCM の MIC と変異の数の間の相関係数を示している。

Strains	OXA	VCM	VCM +OXA	Strains	OXA	VCM	VCM +OXA
MR1	> 128	2	1	VR1	> 128	16	2
MR2	> 128	2	1	VR2	> 128	16	2
MR3	> 128	1	1	VR3	> 128	32	2
MR4	32	2	< 0.5	VR4	> 128	32	4
MR5	> 128	2	1	VR5	> 128	16	2
MR6	64	2	1	VR6	> 128	32	2
MR7	> 128	1	1	VR7	> 128	32	2
MR8	> 128	2	1	VR8	> 128	16	2

Table 7. MRSA8 株および変異原処理により得られた VRSA8 株に対する、VCM とオキサシリン (OXA) の併用効果

OXA と VCM の MIC、および OXA を併用した場合の VCM の MIC を微量希釈法により測定した (37°C、48 時間)。この実験において VCM と併用した OXA 濃度は 2 $\mu\text{g/ml}$ であった。単位: $\mu\text{g/ml}$ 。

Strains	CTRX	VCM	VCM +CTRX	Strains	CTRX	VCM	VCM +CTRX
MR1	> 128	2	1	VR1	> 128	16	2
MR2	> 128	2	1	VR2	> 128	16	2
MR3	> 128	4	2	VR3	> 128	32	4
MR4	64	1	< 0.5	VR4	> 128	32	8
MR5	> 128	1	2	VR5	> 128	16	4
MR6	128	1	1	VR6	> 128	32	4
MR7	> 128	1	1	VR7	> 128	32	4
MR8	> 128	1	< 0.5	VR8	> 128	16	8

Table 8. MRSA8 株および変異原処理により得られた VRSA8 株に対する、VCM とセフトリアキソン (CTRX) の併用効果

CTRX と VCM の MIC、および CTRX を併用した場合の VCM の MIC を微量希釈法により測定した (37°C、48 時間)。この実験において VCM と併用した CTRX 濃度は 4 $\mu\text{g/ml}$ であった。単位: $\mu\text{g/ml}$ 。

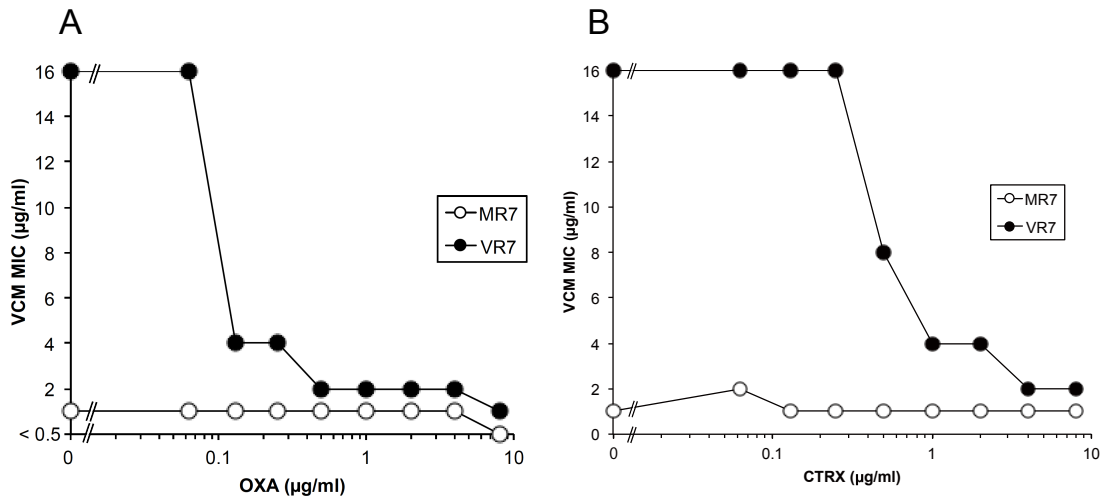


Fig. 5. VRSA に対する VCM との併用効果における OXA および CTRX の用量依存性

各濃度 (0、0.063、0.125、0.25、0.5、1、2、4、8 $\mu\text{g/ml}$) の (A) OXA および (B) CTRX を併用した場合の、MR7 および VR7 に対する VCM の MIC を微量希釈法により測定した (37°C、48 時間)。単位: $\mu\text{g/ml}$ 。

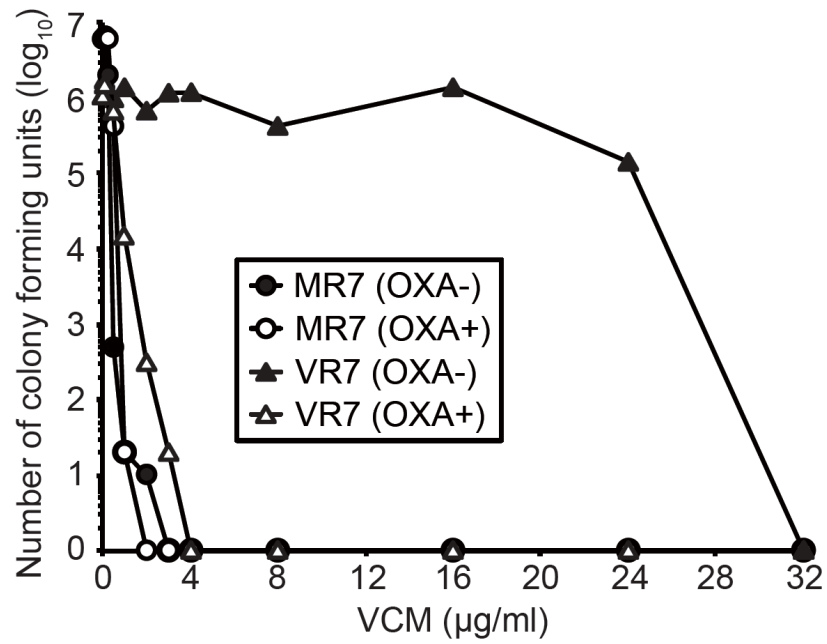


Fig. 6. OXA 存在時における Population 解析

MR7 および VR7 の培養液を希釈し、様々な濃度の VCM に加えて OXA (2 μg/ml) を含む、もしくは含まない BHI 寒天培地に塗布した。37 °C、72 時間培養後のコロニーをカウントした。

Strains	VCM	CFZ	OXA	DMPPC	ABPC	PCG	CBPC	CTRX	CEX	MCIPC
MR7	1	256	256	> 256	16	32	64	> 256	> 128	64
VR7	16	128	128	> 256	8	16	64	> 256	128	> 128

Table 9. MR7 および VR7 に対する、各種 β -ラクタム系抗生物質の MIC

MR7 及び VR7 に対する各 β -ラクタム系抗生物質の MIC を微量希釈法により測定した (37 °C 、 48 時間)。単位: $\mu\text{g/ml}$ 。

VCM, バンコマイシン; CFZ, セファゾリン; OXA, オキサシリン; DMPPC, メチシリン;
 ABPC, アンピシリン; PCG, ベンジルペニシリン; CBPC, カルベニシリン; CTRX, セフ
 トリアキソン; CEX, セファレキシン; MCIPC, クロキサシリン

	VCM	VCM	VCM	VCM	VCM	VCM	VCM	VCM	VCM	VCM
Strains	VCM	+CFZ	+OXA	+DMPPC	+ABPC	+PCG	+CBPC	+CTRX	+CEX	+MCIPC
MR7	1	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	1	1	< 0.5
VR7	16	1	1	2	1	1	1	4	4	1

Table 10. *In vitro* における MR7 および VR7 に対する、VCM と各 β -ラクタム系抗生物質の併用効果

各 β -ラクタム系抗生物質を併用した場合の、MR7 および VR7 に対する VCM の MIC を微量希釈法により測定した (37 °C 、48 時間)。この実験において、VCM との併用した各 β -ラクタム系抗生物質の濃度は 2 μ g/ml であった。単位: μ g/ml。

VCM, バンコマイシン; CFZ, セファゾリン; OXA, オキサシリン; DMPPC, メチシリン; ABPC, アンピシリン; PCG, ベンジルペニシリン; CBPC, カルベニシリン; CTRX, セフトリアキソン; CEX, セファレキシリン; MCIPC, クロキサシリン

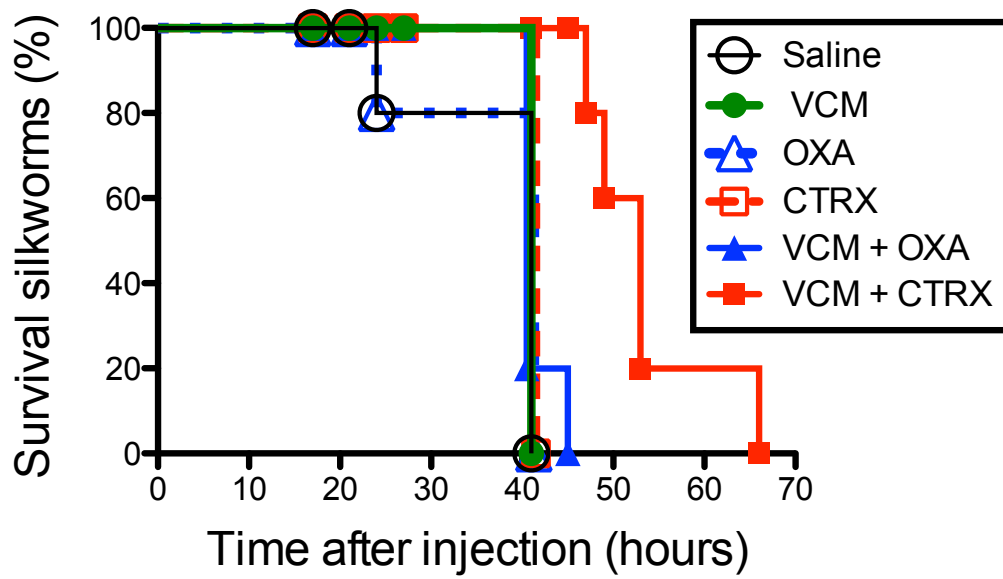


Fig. 7. VRSA 感染カイコに対する VCM と CTRX の併用による延命効果

VR7 感染カイコに対して、生理食塩水、VCM、OXA、および CTRX を単独投与もしくは VCM と OXA、VCM と CTRX を併用投与した場合の、各時間におけるカイコの生存率を測定した。注射菌数= 1.1×10^8 cfu/匹。n=5 /群。

Antibiotics	LT ₅₀ (hours)	P value
Saline	32	-
VCM	34	-
OXA	32	-
CTRX	34	-
VCM + OXA	36	0.31
VCM + CTRX	50	< 0.0001

Table 11. VCM と β -ラクタム系抗生物質投与時の VR7 感染カイコの治療効果

VCM、OXA、CTRX を単独投与もしくは、VCM と OXA もしくは CTRX を併用投与した場合の VR7 感染カイコの LT₅₀（半数致死時間）を算出した。また統計処理として、VCM を単独投与した群と VCM と β -ラクタム系抗生物質を併用投与した群の生存曲線を Log-rank test に供し、P 値を算出した。

Strains	VCM	CS	BC	FOM	EM	LCM	GM	TC	LVFX	NC
MR7	1	64	64	> 256	> 256	> 256	256	128	> 256	> 256
VR7	16	64	128	> 256	> 256	> 256	> 256	128	> 256	> 256

Table 12. MR7 および VR7 に対する、各種抗生物質の MIC

MR7 および VR7 に対する、作用機序の異なる各種抗生物質の MIC を微量希釈法により測定した (37 °C 、 48 時間)。単位: $\mu\text{g/ml}$ 。

VCM, バンコマイシン; CS, D-サイクロセリン; BC, バシトラシン; FOM, ホスホマイシン; EM, エリスロマイシン; LCM, リンコマイシン; GM, ゲンタマイシン; TC, テトラサイクリン; LVFX, レボフロキサシン.; NC, ナイシン

Strains	VCM	VCM	VCM	VCM	VCM	VCM	VCM	VCM	VCM	VCM
	+ CS	+ BC	+ FOM	+ EM	+ LCM	+ GM	+ TC	+ LVFX	+ NC	
MR7	1	2	1	1	2	1	2	1	1	
VR7	4	16	16	16	16	16	8	16	16	

Table 13. *In vitro* における MR7 および VR7 に対する、VCM と各種抗生物質の併用効果

各抗生物質を併用した場合の、MR7 および VR7 に対する VCM の MIC を微量希釈法により測定した (37 °C 、48 時間)。この実験において、VCM と併用した各抗生物質の濃度は 20 µg/ml であった。単位: µg/ml。

VCM, バンコマイシン; CS, D-サイクロセリン; BC, バシトラシン; FOM, ホスホマイシン; EM, エリスロマイシン; LCM, リンコマイシン; GM, ゲンタマイシン; TC, テトラサイクリン; LVFX, レボフロキサシン.; NC, ナイシン

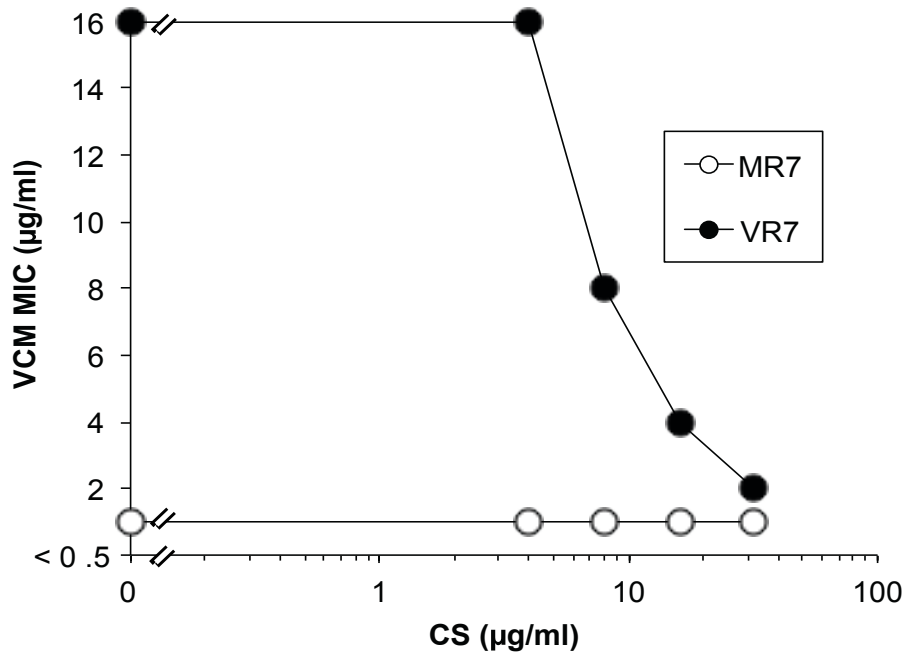


Fig. 8. VRSA に対する VCM との併用効果における D-サイクロセリン (CS) の用量依存性

各濃度 (0、4、8、16、32 μg/ml) の CS を併用した場合の、MR7 および VR7 に対する VCM の MIC を微量希釈法により測定した (37 °C 、48 時間)。単位: μg/ml。

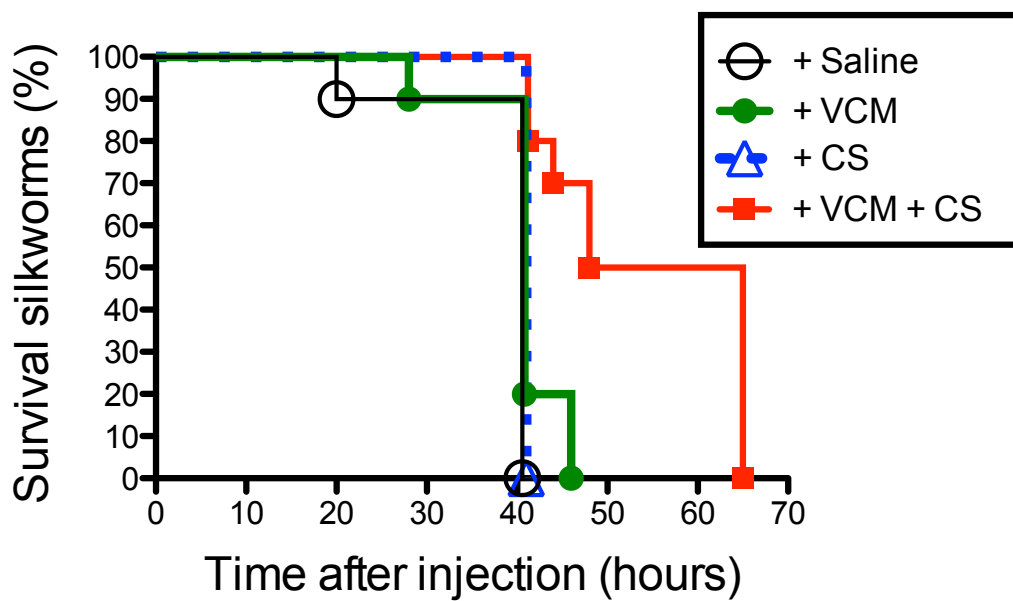


Fig. 9. VRSA 感染カイコに対する VCM と CS の併用による延命効果

VR7 感染カイコに対して、生理食塩水、VCM および CS を単独投与もしくは VCM と CS を併用投与した場合の、各時間におけるカイコの生存率を測定した。

注射菌数=0.9×10⁸ cfu/匹。n=10/群。

Antibiotics	LT ₅₀ (hours)	P value
Saline	34	-
VCM	36	-
CS	35	-
VCM + CS	48	0.001

Table 14. VCM と CS 投与時の VR7 感染カイコの治療効果

VCM と CS を単独もしくは併用投与した場合の VR7 感染カイコの LT₅₀ を算出した。

また、統計処理として、VCM を単独投与した群と VCM と CS を併用投与した群の生存曲線を Log-rank test に供し、P 値を算出した。

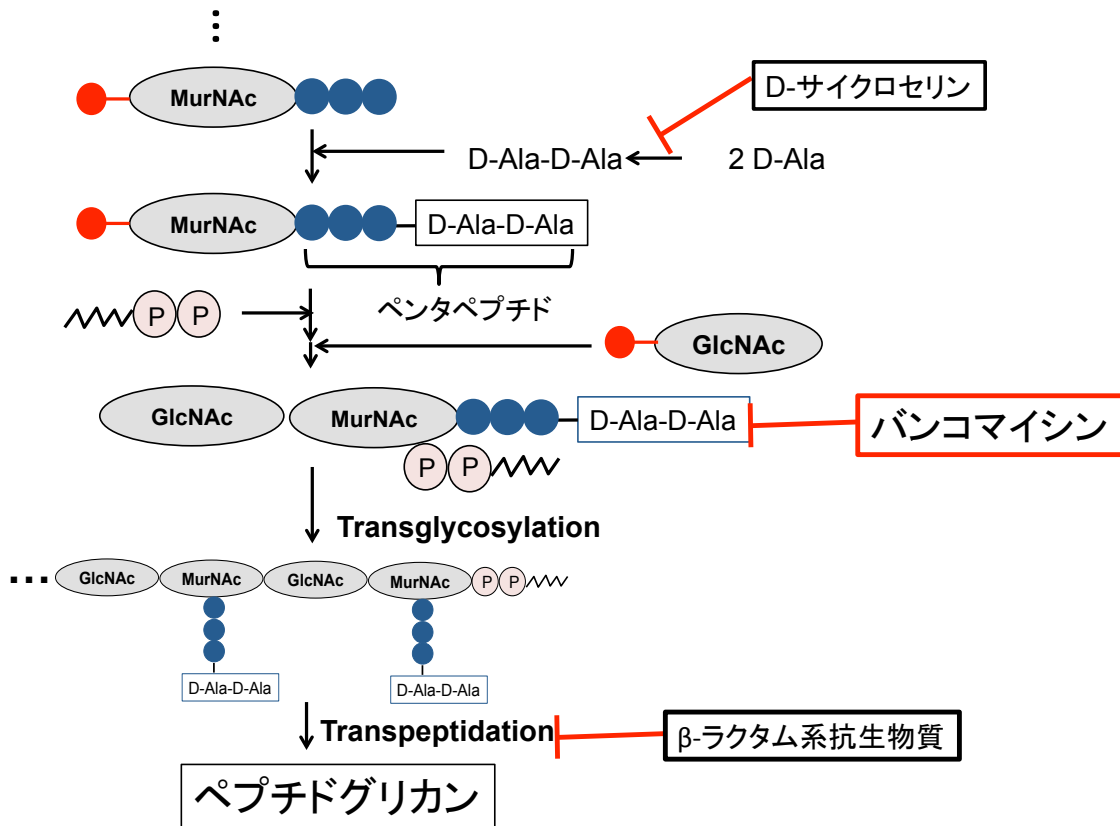


Fig. 10. 黄色ブドウ球菌のペプチドグリカン生合成経路と、各抗生物質の作用点

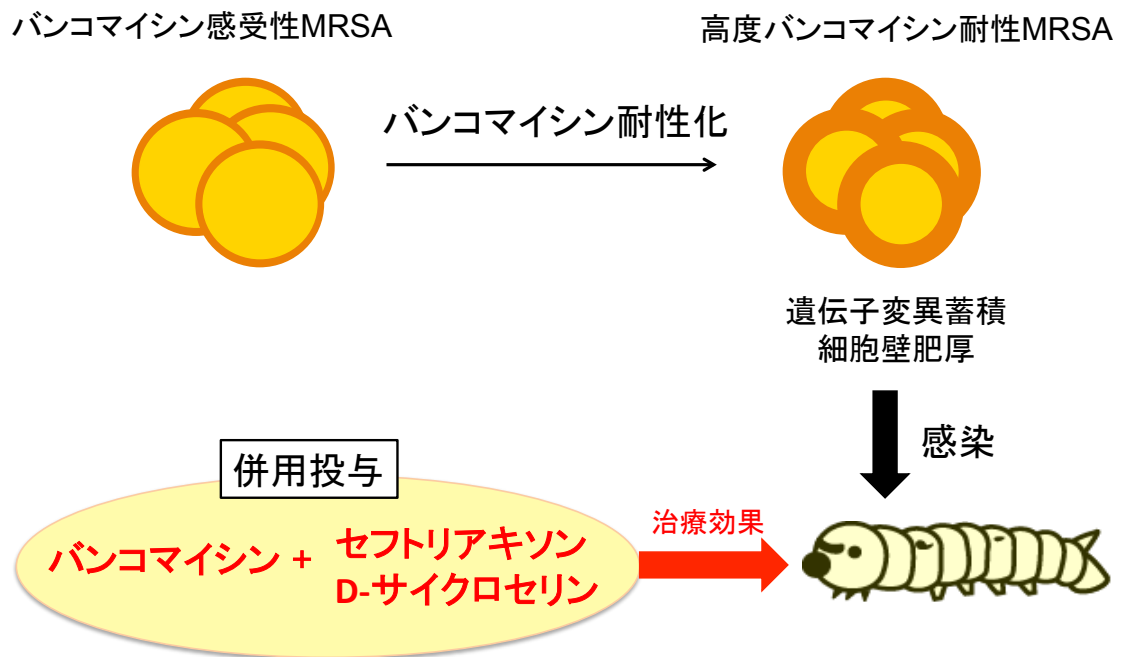


Fig. 11. 本研究から得られた、VRSA 感染症に対する治療戦略の候補のモデル図

発表論文

Kenichi Ishii, **Fumiaki Tabuchi**, Miki Matsuo, Keita Tatsuno, Tomoaki Sato, Mitsuhiro Okazaki, Hiroshi Hamamoto, Yasuhiko Matsumoto, Chikara Kaito, Tetsuji Aoyagi, Keiichi Hiramatsu, Mitsuo Kaku, Kyoji Moriya, Kazuhisa Sekimizu.

Phenotypic and genomic comparisons of highly vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains developed from multiple clinical MRSA strains by *in vitro* mutagenesis.

Scientific Reports. 2015, 5 : 17092

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導を賜りました東京大学大学院薬学系研究科微生物薬品化学教室の関水和久教授に深く感謝申し上げます。関水先生には、研究に対する前向きな心構えとオリジナルの発想のもとに研究を行なうべきという強い意識を教えて頂きました。今の私があるのは、関水先生に背中を押して頂けたからであり、感謝してもし尽くすことができません。

垣内力准教授には、折に触れて研究に対する助言を頂くと共に、生物学者として、かくあるべきという姿勢を教えて頂きました。厚く御礼申し上げます。

浜本洋助教には、研究の随所で有益な議論をして頂きました。深く感謝申し上げます。

松本靖彦助教には、私の興味を追究できる様に常にサポートをしていただきました。また、日々の議論において、基本的なことから研究者としての哲学まで多くのことを教えて頂きました。停滞しがちな私に対して、常に励ましの言葉をかけて下さり、感謝の念に堪えません。

本学位論文の作成に際し、御指導を賜りました東京大学大学院薬学系研究科の堅田利明教授、一條秀憲教授、三浦正幸教授、八代田英樹准教授に心より感謝申し上げます。

菌株の分与や、研究を通して有益な御助言を賜りました東京大学大学院医学系研究科の森屋恭爾教授、龍野桂太先生、佐藤智明先生、東京工科大学医療保健学部の岡崎充宏教授、および東北大学大学院医学系研究科の賀来満夫教授、青柳哲史先生に深く感謝申し上げます。

順天堂大学大学院医学系研究科の平松啓一教授および松尾美記先生には、電子顕微鏡観察および全ゲノム配列の解析においてご協力を頂きました。厚く感謝申し上げます。

現ソーク研究所の石井健一先生には、本研究を通して実際に一緒に手を動かし、得られた結果について議論して頂くことで、情熱的に研究に取り組む姿勢を教えて頂きました。深く感謝申し上げます。

微生物薬品化学教室の方々には、終止励ましの言葉を頂き、大変お世話になりました。厚く御礼申し上げます。

最後に、何度も挫折を繰り返し、この年齢になるまで引き延ばしてしまった目標の実現のために、経済的、精神的に支援して頂いた家族に感謝申し上げます。