

新規キノロン系抗菌薬 DS-8587 の抗 *Acinetobacter*  
*baumannii* 活性に関する研究

2013 年度

京都薬科大学 課程博士学位論文

樋口 才飛



本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

- 1) Saito Higuchi, Yoshikuni Onodera, Megumi Chiba, Kazuki Hoshino, and Naomasa Gotoh. 2013. Potent *in vitro* antibacterial activity of DS-8587, a novel broad-spectrum quinolone, against *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* **57**:1978-81. [第 1 章第 1, 4 節、第 2 章第 6~8 節]
- 2) Saito Higuchi, Mototsugu Shikata, Megumi Chiba, Kazuki Hoshino, and Naomasa Gotoh. Characteristics of antibiotic resistance and sequence type of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Japan and the antibacterial activity of DS-8587. *J. Infect Chemother.*, in press. [第 1 章第 1 節、第 2 章第 1~5 節]
- 3) Saito Higuchi, Yuichi Kurosaka, Saori Uoyama, Kumi Yoshida, Megumi Chiba, Chiaki Ishii, Katsuko Fujikawa, Yukie Karibe, and Kazuki Hoshino. Anti-multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* activity of DS-8587: in vitro activity and in vivo efficacy in a murine calf muscle infection model. *J. Infect Chemother.*, in press. [第 1 章第 2, 3 節、第 3 章]



## 目次

要旨 .....	1
緒論 .....	3
第 1 章 DS-8587 の <i>A. baumannii</i> に対する <i>in vitro</i> 抗菌作用の検討 .....	8
諸言 .....	8
材料および方法 .....	8
結果 .....	10
考察 .....	13
第 2 章 キノロン耐性機序による DS-8587 の抗菌活性の変化 .....	14
諸言 .....	14
材料および方法 .....	14
結果 .....	20
考察 .....	27
第 3 章 多剤耐性 <i>A. baumannii</i> を用いたマウス腓腹筋感染モデルにおける DS-8587 の抗菌効果 .....	29
諸言 .....	29
材料および方法 .....	29
結果 .....	31
考察 .....	34
総括 .....	35
謝辞 .....	37
参考文献 .....	38



# 要旨

## はじめに

グラム陰性桿菌である *Acinetobacter baumannii* は、肺炎、血流感染症、尿路感染症、皮膚軟部組織感染症といった院内感染症を引き起こす。近年、*A. baumannii* の既存抗菌薬に対する耐性化が深刻な問題となっている。キノロン系抗菌薬に対する耐性化は進行し、かつては良好な活性を示していた ciprofloxacin や levofloxacin に対する耐性菌が全世界で蔓延している。さらに  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬であるカルバペネム、アミノグリコシド系抗菌薬、およびキノロン系抗菌薬の全てに耐性を示す多剤耐性 *A. baumannii* が出現し、当該菌に有効な新規抗菌薬の開発が望まれている。その耐性機構として、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬を分解する  $\beta$ -ラクタマーゼ産生、抗菌薬排出システムの過剰発現、外膜透過性の低下、標的変異などが挙げられる。キノロン系抗菌薬に対する耐性機作として、標的酵素である DNA gyrase あるいは DNA topoisomerase IV の変異によるキノロンとの親和性低下、抗菌薬排出システムである RND 型の AdeABC および MFS 型の AbeM の発現亢進が報告されている。キノロン系抗菌薬は、高い抗菌活性、幅広い抗菌スペクトラム、および短時間殺菌作用を有し、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬やアミノグリコシド系抗菌薬と作用機作が異なることから長年臨床で使用されてきた抗菌薬である。本研究では、新規キノロン系抗菌薬である DS-8587 の ciprofloxacin 耐性 *A. baumannii* に対する活性を検討することにより、新規抗 *A. baumannii* 薬としての資質を検証した。

## 1. DS-8587 の *A. baumannii* に対する *in vitro* 抗菌作用の検討

DS-8587 の i) ciprofloxacin 耐性および多剤耐性 *A. baumannii* に対する抗菌活性、ii) 殺菌作用、および iii) 耐性菌出現頻度について検討した。39 株の ciprofloxacin 耐性 *A. baumannii* に対する DS-8587 の抗菌活性を測定したところ、被験菌株の 90%の発育を阻止する濃度である MIC<sub>90</sub> は 2 mg/L であり、ciprofloxacin と比べて 32 倍以上、levofloxacin と比べて 16 倍活性が高いことが分かった。7 株の多剤耐性 *A. baumannii* に対する DS-8587 の MIC range は 0.25-2 mg/L であり、他系統抗菌薬を上回る高い活性を示した。また、DS-8587 はキノロン系抗菌薬の特長である短時間殺菌力が認められ、ciprofloxacin より耐性菌出現頻度が低かった。これらの結果から、DS-8587 は ciprofloxacin 耐性 *A. baumannii* に対して高い活性を示すことが明らかとなった。

## 2. キノロン耐性機序による DS-8587 の抗菌活性の変化

DS-8587 が ciprofloxacin 耐性 *A. baumannii* に対して高活性を示す要因を検討するため、*A. baumannii* の ciprofloxacin 耐性機作が DS-8587 の抗菌活性に及ぼす影響について検討した。31 株の ciprofloxacin 耐性株を用いて抗菌薬排出システム阻害薬である 1-(1-naphthylmethyl)- piperazine (NMP) 添加時の抗菌活性を測定したところ、NMP 添加により MIC が 4 倍以上変動する株が ciprofloxacin では 7 株であったのに対し、DS-8587 では 3 株であることを見出した。次に、キノロン系抗菌薬の標的酵素である DNA gyrase および DNA topoisomerase IV の両方に変異を有する ciprofloxacin 耐性株で DS-8587 の両酵素に対する阻害活性を測定したところ、ciprofloxacin と比べ

て DNA gyrase では 8.4 倍、DNA topoisomerase IV では 5.6 倍高い標的酵素阻害活性であることを見出した。この結果から、DS-8587 の特徴的な側鎖が高い阻害活性に寄与していることが推測された。また、抗菌薬排出システムについて検討するため、実験室で作製した *adeABC* 高発現株および *abeM* 高発現株に対する抗菌活性を測定したところ、DS-8587 は ciprofloxacin と比べて親株と高発現株との MIC 変動幅が小さいことが分かった。以上の結果から、DS-8587 が ciprofloxacin 耐性 *A. baumannii* に対して優れた抗菌活性を示す要因として、標的酵素阻害活性が強く、抗菌薬排出システムの影響を受けにくいことが明らかとなった。

### 3. 多剤耐性 *A. baumannii* を用いたマウス腓腹筋感染モデルにおける DS-8587 の抗菌効果

*In vitro* で見出された DS-8587 の高い抗 ciprofloxacin 耐性および多剤耐性 *A. baumannii* 活性が *in vivo* 抗菌効果にも反映されるか検討するため、また、DS-8587 の臨床効果を最大限にするための投与方法を明らかにし、抗菌効果を得るために必要な PK/PD パラメーター値を算出するため、既存抗菌薬において臨床効果との相関性が示されているマウス腓腹筋感染モデルを用いて、DS-8587 の多剤耐性 *A. baumannii* に対する *in vivo* 抗菌効果を検討した。各用量を 2、4、あるいは 8 分割して DS-8587 を投与したところ、分割投与による抗菌作用の増強あるいは減弱は認められず、計 256 mg/kg を投与することにより *in vivo* 抗菌効果が認められた。Pharmacokinetic-pharmacodynamic

(PK/PD) 解析により、腓腹筋内の菌数は AUC/MIC に相関することが分かった。また、腓腹筋内の菌数増加を抑制するために必要な AUC/MIC は 29.4 であることを見出した。以上の結果より、DS-8587 は多剤耐性 *A. baumannii* に対して *in vivo* 抗菌効果を示し、その効果は AUC/MIC が 29.4 で認められることが明らかとなった。

### 総括

本研究により、新規キノロン系抗菌薬 DS-8587 が ciprofloxacin 耐性および多剤耐性 *A. baumannii* に対して高い *in vitro* 活性および *in vivo* 抗菌効果を示すことを明らかにした。この結果は、本薬の臨床試験推進を支持する結果である。DS-8587 の *in vivo* 抗菌効果には AUC が重要であることが明らかとなったが、キノロン系抗菌薬は大動物になるにつれて体内からの消失が遅くなる傾向があり、ヒトではマウスよりも低い用量で目標とする AUC に達することが期待される。第 1 相試験での DS-8587 投与量と AUC の相関関係、それを基に決められる用法・用量で第 2 相試験での効果が認められるかが上市へ向けた課題の 1 つである。今後、本薬が臨床試験を経て上市され、*A. baumannii* による感染症に苦しむ患者を救うことが期待される。



## 緒論

*Acinetobacter baumannii* はグラム陰性桿菌であり、肺炎、血流感染症、尿路感染症、および皮膚軟部組織感染症といった日和見感染による院内感染症を引き起こす起因菌である (1)。

*Acinetobacter* 属では 33 菌種が報告されており、土壌、水、および動物など自然界に広く存在する (2)。また、*Acinetobacter* 属の中で院内感染症を引き起こすのは 80%以上が *A. baumannii* であると報告されている (3)。*A. baumannii* は乾燥に強く、皮膚や環境中で長時間生存可能であることが院内感染でのアウトブレイクを引き起こす原因とされており、医療現場でのアウトブレイク発生源特定を困難にさせている。我が国における本菌の院内感染症起因菌としての分離頻度は高くはなく、増加傾向もないが、北南米および欧州では院内肺炎起因菌の中で第 3 位～第 5 位を占めるほど分離頻度は高い (Table 1) (4)。

**Table 1. Regional incidence of pathogens isolated from patients hospitalized with pneumoniae in the 5 years of SENTRY antimicrobial surveillance program (31,436 cases).**

Pathogen	Incidence (%)			
	All regions	United States	Europe	Latin America
<i>Staphylococcus aureus</i>	28.0	36.3	23.0	20.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21.8	19.7	20.8	28.2
<i>Klebsiella</i> species	9.8	8.5	10.1	12.1
<i>Escherichia coli</i>	6.9	4.6	10.1	5.5
<b><i>Acinetobacter</i> species</b>	<b>6.8</b>	<b>4.8</b>	<b>5.6</b>	<b>13.3</b>
<i>Enterobacter</i> species	6.3	6.5	6.2	6.2

Jones RN. *Clin. Infect. Dis.*, **51**:S81-87 (2010).

臨床分離株の系統解析を行う方法のひとつとして multilocus sequence typing (MLST) 法がある。これは、7 種類のハウスキーピング遺伝子の塩基配列を解析し、その配列情報を Pasteur データベース (PF8: <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html>) と照合することで決定される sequence type (ST) 番号が同じであれば同じ系統であると推定する解析である (5)。臨床分離 *A. baumannii* では ST-1、ST-2、および ST-3 が世界的に数多く報告されており (5, 6)、特定のクローンの伝播が示唆されている。

キノロン系抗菌薬である ciprofloxacin や levofloxacin は臨床で汎用されることから、耐性菌の増加が問題となっている。世界的にみると *Staphylococcus aureus*、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、および *A. baumannii* では耐性率の増加が認められている (7-9)。近年、さらに *A. baumannii* において  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬であるカルバペネム、アミノグリコシド系抗菌薬、およびキノロン系抗菌薬の全てに耐性を示す多剤耐性 *A. baumannii* の蔓延が報告されている (Fig. 1) (10)。多剤耐性 *A. baumannii* に対し、環状ポリペプチド系抗菌薬である colistin やテトラサイクリン系抗菌薬である tigecycline が有効であるが (11-13)、colistin は安全性の問題が、tigecycline は臨床的有効性が高く



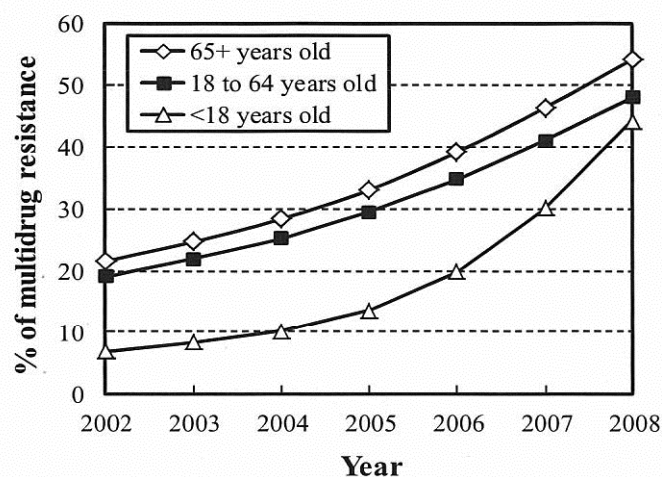


Fig. 1. Percentage of multidrug resistant *A. baumannii* in US by year and age groups.

Mera RM, et al. *Microb. Drug Resist.* 16:209-215 (2010).

ない。また、両抗菌薬に対する耐性菌も既に報告されており (14-17)、多剤耐性菌にも有効な新規抗菌薬が必要とされている。

*A. baumannii* は、染色体上にコードされている AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼを恒常的に産生することによりセファロsporin系抗菌薬に対して自然耐性を示す (18)。一方、獲得耐性機序として、i) OXA 型カルバペネマーゼ (OXA-51-like) の遺伝子上流にプロモーター活性を有する *ISAbal* の挿入、あるいは OXA-23-like や OXA-58-like などのカルバペネマーゼ遺伝子の獲得、ii) アミノグリコシド系抗菌薬に対する修飾酵素産生、iii) 標的変異による親和性低下、iv) 抗菌薬が標的へ

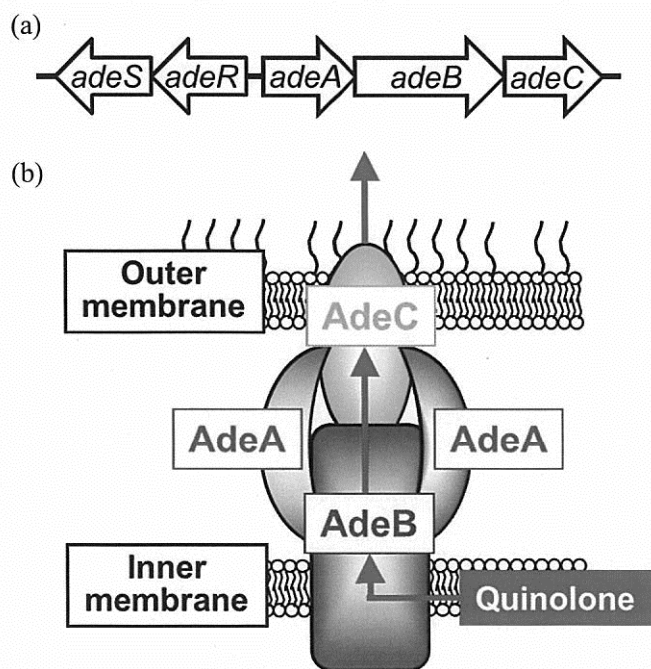


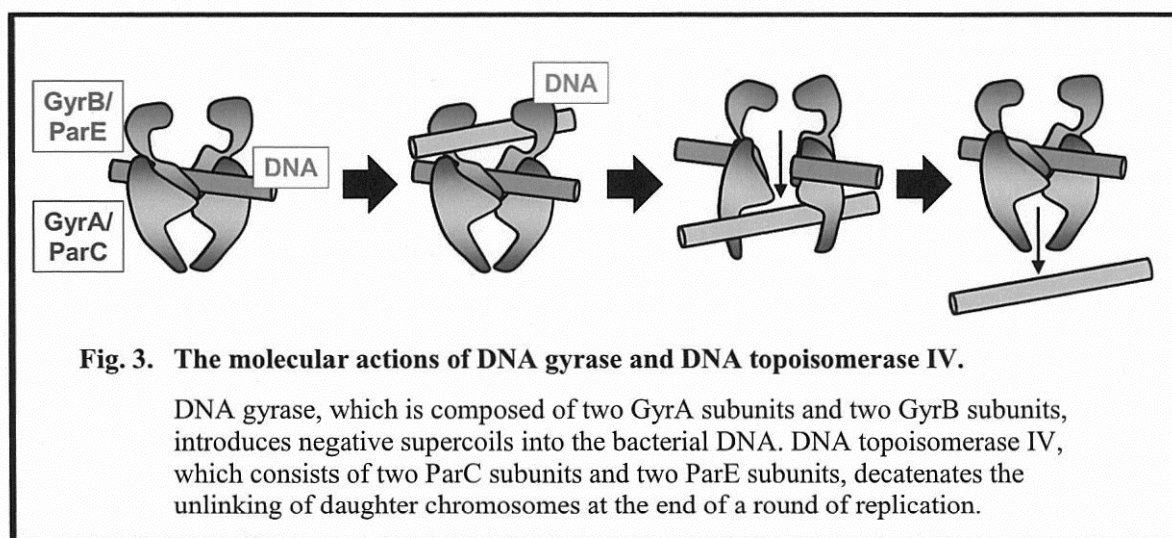
Fig. 2. AdeABC efflux system of *A. baumannii*.

(a) Schematic representation of operon for AdeABC efflux system in *A. baumannii*. Open arrows represent coding sequences and indicate direction of transcription (b) Schematic drawing of AdeABC efflux system. AdeA: membrane fusion protein, AdeB: multidrug transporter, AdeC: Outer membrane protein.

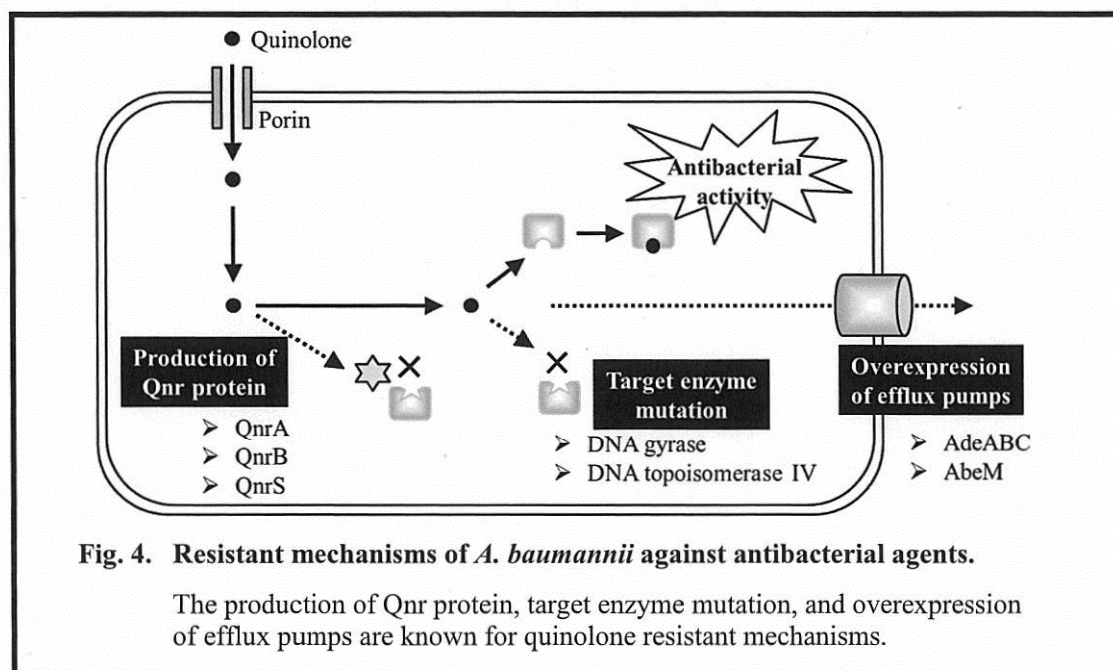
Wieczorek P, et al. *Folia Histochem. Cytobiol.* 46:257-267. (2008).

結合するのを妨げる 16S rRNA メチラーゼあるいは Qnr タンパク産生、v) 抗菌薬排出システムの過剰発現が報告されている (19-21)。これらの耐性機序が組み合わさることにより、当該菌の多剤耐性化が引き起こされると考えられる。

抗菌薬排出システムとして、細胞質膜内外に形成されたナトリウムイオン勾配を駆動力とする multidrug and toxic compound extrusion (MATE) ファミリー、ATP を加水分解して駆動力とする ATP-binding cassette (ABC) スーパーファミリー、あるいは細胞質膜内外に形成されたプロトン勾配を駆動力とする small multidrug resistance (SMR) ファミリー、major facilitator superfamily (MFS) ファミリー、および resistance-nodulation-cell division (RND) ファミリーが挙げられる (22)。



Schoeffler AJ, et al. *Biochem. Soc. Trans.* **33**:1465-1470. (2005).



Gootz TD, et al. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **6**:309-325 (2008),  
 Gordon NC, et al. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **35**:219-226 (2010),  
 Zavascki AP, et al. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **8**:71-93 (2010).



<b>GyrA</b>	<i>E. coli</i>	67	ARVVGDVIGKYHPHGD	83	SAVYD	87	TIVRMAQPFSRLRYMLVDG	Q	106
			↓		↓	↓		↓	
			S		CGLP	N, V		H	
					D W	G, Y		R	
					A	A, H			
<i>P. aeruginosa</i>		67	.....	83	TA	87	D	Q	106
					↓	↓		↓	
					IP	N, Y		L	
					A	G, H			
<i>S. pneumoniae</i>		65	. . I T . . . M . . . . .	81	SSI	85	EAM	WW.Y	H 104
					↓	↓			
					F, Y	K, Q			
					C	G			
<i>S. aureus</i>		68	. . I . . . . M . . . . .	84	SSI	88	EAM	D . . Y . . P . . . G .	107
					↓	↓		↓	
					L, A P	K		D	
					V, K	G			
<i>A. baumannii</i>		65	.....	81	S	85	E	D . . . . L . . . .	104
					↓	↓			
					V L	G			
					C				
<b>ParC</b>	<i>E. coli</i>	64	ARTVGDVLGKYHPHGD	80	SAC	84	YEAMVLMAQPFSYRYPLVDGQ		103
				↓	↓	↓			
				D	L	K			
					I	G			
					R	V			
<i>P. aeruginosa</i>		71	..... F . . . . .	87	SA	91	E	L	110
				↓	↓	↓		↓	
					LP	K		Q	
					W				
<i>S. pneumoniae</i>		63	AKS . . NIM . NF . . . .	79	DSSI	83	D . . . R . S . NWKNREI . . EMH		102
			↓	↓	↓	↓		↓	
			Y		NF	N		E C	
					Y	G			
					A	V			
<i>S. aureus</i>		64	. K . . . D . I . Q . . . .	80	SSV	84	E . . . RLS . DWKL . HV . IEMH		103
			↓	↓	↓	↓		↓	
			Y		C	K, L		Y	
					FP	V, A			
					Y	G, A			
<i>A. baumannii</i>		68	.....	84	S	88	E	I E . .	107
				↓	↓	↓			
				C	L	K			
					F				

**Fig. 5. The mutation in quinolone resistance determining region (QRDR) of GyrA and ParC.**

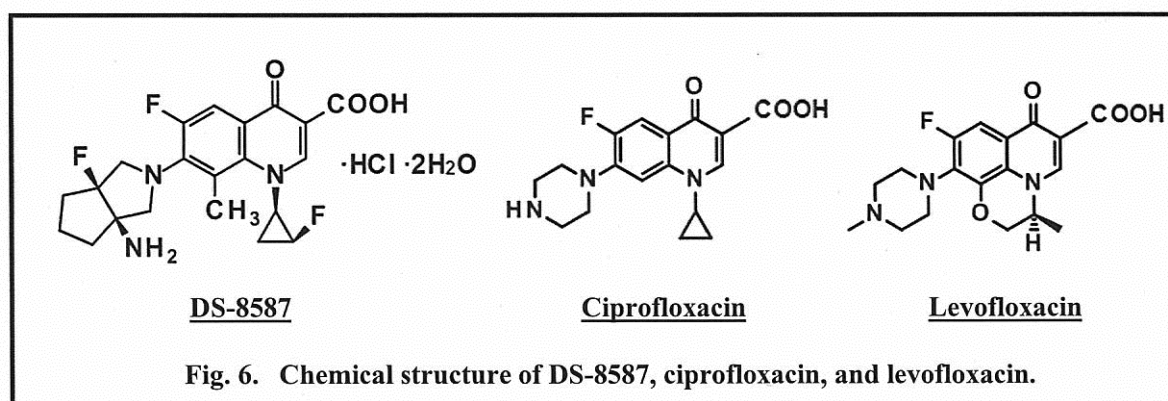
The amino acid substitutions in GyrA and ParC affecting fluoroquinolone activity are listed.

David C. Hooper, et al. *Quinolone Antimicrobial Agents*, 3rd Edition. 41-68 (2003),  
Higgins PG, et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:1613-1615 (2010).



*A. baumannii* の抗菌薬耐性に寄与するものとして、RND 型の AdeABC (Fig. 2)、AdeFGH および AdeIJK、および MFS 型の AbeM が報告されている (23, 24)。

キノロン系抗菌薬は、ATP 依存的な II 型 DNA topoisomerase である DNA gyrase および DNA topoisomerase IV (Fig. 3) (25) を標的とし、幅広い菌種に対して強い殺菌力を発揮し、良好な組織移行性を示すことから、呼吸器感染症や尿路感染症を含む各種細菌感染症に対して臨床で使用される重要な抗菌薬の系統の 1 つである。当該抗菌薬に対する耐性機序として、標的酵素である DNA gyrase あるいは DNA topoisomerase IV の変異によるキノロンとの親和性低下 (26)、抗菌薬排出システムである AdeABC および AbeM の発現亢進 (24)、キノロンの標的酵素への結合を妨げる Qnr タンパクの産生 (27) が挙げられる (Fig. 4)。標的酵素変異について *E. coli*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Streptococcus pneumoniae*、*S. aureus*、*A. baumannii* の臨床分離株あるいは実験室作製キノロン耐性株における変異箇所は、各菌種の *E. coli* における GyrA の 67 位～106 位および ParC の 64 位～103 位の相同位 (キノロン耐性決定領域：QRDR) に局在し、特に GyrA の 83 位および 87 位、あるいは ParC80 位および 84 位の相同位に変異が集中している (Fig. 5) (28, 29)。2010 年に Wohlkonig らによって、キノロン、*A. baumannii* の DNA topoisomerase IV、および DNA の 3 者複合体の結晶構造解析結果が報告された (30)。DNA topoisomerase IV の ParC84 位 Ser および同 88 位 Glu がマグネシウムイオンおよび水分子を介してキノロンと結合していることが示され、これらアミノ酸が変異することによりキノロンと DNA topoisomerase IV との結合が弱くなることが証明された。



基礎報文 2) の Figure 1 を改変した。

新規キノロン系抗菌薬である DS-8587 (Fig. 6) (31) はキノロン系抗菌薬の特長である広い抗菌スペクトラムを有し、各菌種の標準株に対して高い抗菌活性を示すことから、肺炎や尿路感染症への適用を目的に開発研究が進められている。その高い抗菌活性から、先述のとおり近年急速に既存抗菌薬に対する耐性化が問題となりつつある *A. baumannii* 感染症に対する効果も期待される。本研究では、DS-8587 の *A. baumannii* に対する抗菌作用を検討するため、臨床分離 ciprofloxacin 耐性 *A. baumannii* に対する活性、殺菌作用、および耐性菌出現頻度を測定した。また、キノロン耐性機序が DS-8587 の活性に及ぼす影響を解析した。さらに、DS-8587 の多剤耐性 *A. baumannii* 感染マウスにおける *in vivo* 抗菌効果を検討した。

## 第1章 DS-8587 の *A. baumannii* に対する *in vitro* 抗菌作用の検討

### 諸言

キノロン系抗菌薬は1962年に nalidixic acid が発見されて以降、抗菌活性の向上、高い安全性、体内動態の改善を目指した誘導体展開が実施された。その後、1978年にキノロン環の6位にフッ素を導入したニューキノロンと呼ばれる norfloxacin が開発された。Norfloxacin は従来のキノロン系抗菌薬よりも抗菌活性が向上し、腸管からの吸収性も改善されたために臨床で幅広く使用されるようになった。現在に至るまで臨床現場で高い頻度で使用されているキノロン系抗菌薬として ciprofloxacin および levofloxacin が挙げられる。しかし、近年は ciprofloxacin 耐性株の出現が問題となっており、*S. aureus*、*E. coli*、および *K. pneumoniae* などで耐性株の増加が認められている(32, 33, 35)。*A. baumannii* の ciprofloxacin あるいは levofloxacin 耐性率も全世界で増加傾向にあり、日本では12.1%(32)であるが、北米では35~52%(34) および日本以外のアジアでは40.2%(35)にのぼっている。新規キノロン系抗菌薬である DS-8587 (31) は、各菌種の標準株に対して ciprofloxacin および levofloxacin よりも高い抗菌活性を有することから、ciprofloxacin 耐性 *A. baumannii* に対しても有効性が期待される。

本章では、臨床分離 *A. baumannii* を用いて最小発育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration : MIC)、短時間殺菌作用、耐性菌出現頻度、および耐性菌出現阻止濃度 (Mutant prevention concentration : MPC) を測定することにより、DS-8587 の ciprofloxacin 耐性および多剤耐性 *A. baumannii* に対する *in vitro* 抗菌作用を調べた。

### 材料および方法

#### 1. 使用菌株

2007年あるいは2010年に日本の臨床各科で分離された *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* complex (32, 33) のうち、*A. baumannii* を選り出して使用した。我が国の感染症法に規定された基準による多剤耐性 *A. baumannii* (MIC for ciprofloxacin:  $\geq 4$  mg/L, imipenem:  $\geq 16$  mg/L, amikacin:  $\geq 32$  mg/L) は、Eurofins Medinet, Inc. (Brussels, Belgium) から分与された株を使用した。

#### 2. 使用培地

BBL Mueller Hinton II Broth (cation adjusted) (CAMHB; Becton, Dickinson and Company, USA)、Difco Mueller Hinton Agar (MHA; Becton, Dickinson and Company, USA)、または Luria-Bertani broth (LB broth; Becton, Dickinson and Company, USA) を用いた。

#### 3. *A. baumannii* の同定

使用菌株を凍結保存ストックよりMHAに塗抹し、44°Cで一晩培養した。発育したコロニーを



CAMHBに懸濁し、35°Cで一晩静置培養した。培養菌液1 mlから遠心分離（7,000×g、5分間、室温）で集菌し、滅菌精製水1 mlに懸濁した。得られた懸濁液を95°Cで5分間処理し、遠心分離（7,000×g、5分間、室温）後の上清をゲノムDNAとして使用した。得られたゲノムDNAを鋳型として、Turtonらの方法（36）に従い $bla_{\text{oxa-51-like}}$  遺伝子の存在を確認し、Changらの方法（37）に従い16S rRNA 遺伝子と23S rRNA遺伝子間の塩基配列により、*A. baumannii*と同定した。

#### 4. 使用抗菌薬と調製

Ciprofloxacin、tigecycline、および imipenem は LKT laboratories, Inc. (USA) から、amikacin は Sigma Aldrich Japan K.K. (日本) から購入し、levofloxacin および DS-8587 は Daiichi Sankyo (日本) で合成されたものを使用した。Ciprofloxacin、levofloxacin、および DS-8587 は、0.1 M NaOH で溶解し、その後の希釈には 0.01 M NaOH を用いた。Imipenem の溶解および希釈には 0.01 M phosphate buffer, pH 7.2 を用い、tigecycline および amikacin の溶解および希釈には滅菌純水を用いた。

#### 5. Minimum inhibitory concentration (MIC) の測定

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の方法（38）に従い微量液体希釈法により行った。

#### 6. 生菌数の測定

調製した菌液をスパイラルプレーター (Eddy Jet; IUL, Spain) を用いて MHA に 50  $\mu$ l 塗抹した。それを 35°C で一夜培養した後、生育したコロニーを目視でカウントして生菌数 (CFU/ml) を算出した。

#### 7. 殺菌活性の測定

使用菌株を凍結保存ストックより CAMHB に接種し、35°C で一晩静置培養した。培養菌液 0.1 ml を CAMHB 200 ml に添加し、37°C で 1 時間振盪培養した。その後、菌液を L 字管に 9.9 ml ずつ分注し、調製した DS-8587 を 0.1 ml 添加後、37°C で振盪培養した。また、0.01N NaOH のみを 0.1 ml 添加したものをコントロールとした。0.5、1、2、および 4 時間後に菌液の一部を採取し、生理的食塩水で適宜希釈した後、上記に従い生菌数を測定した。

#### 8. 耐性菌出現頻度および mutant prevention concentration (MPC) の測定

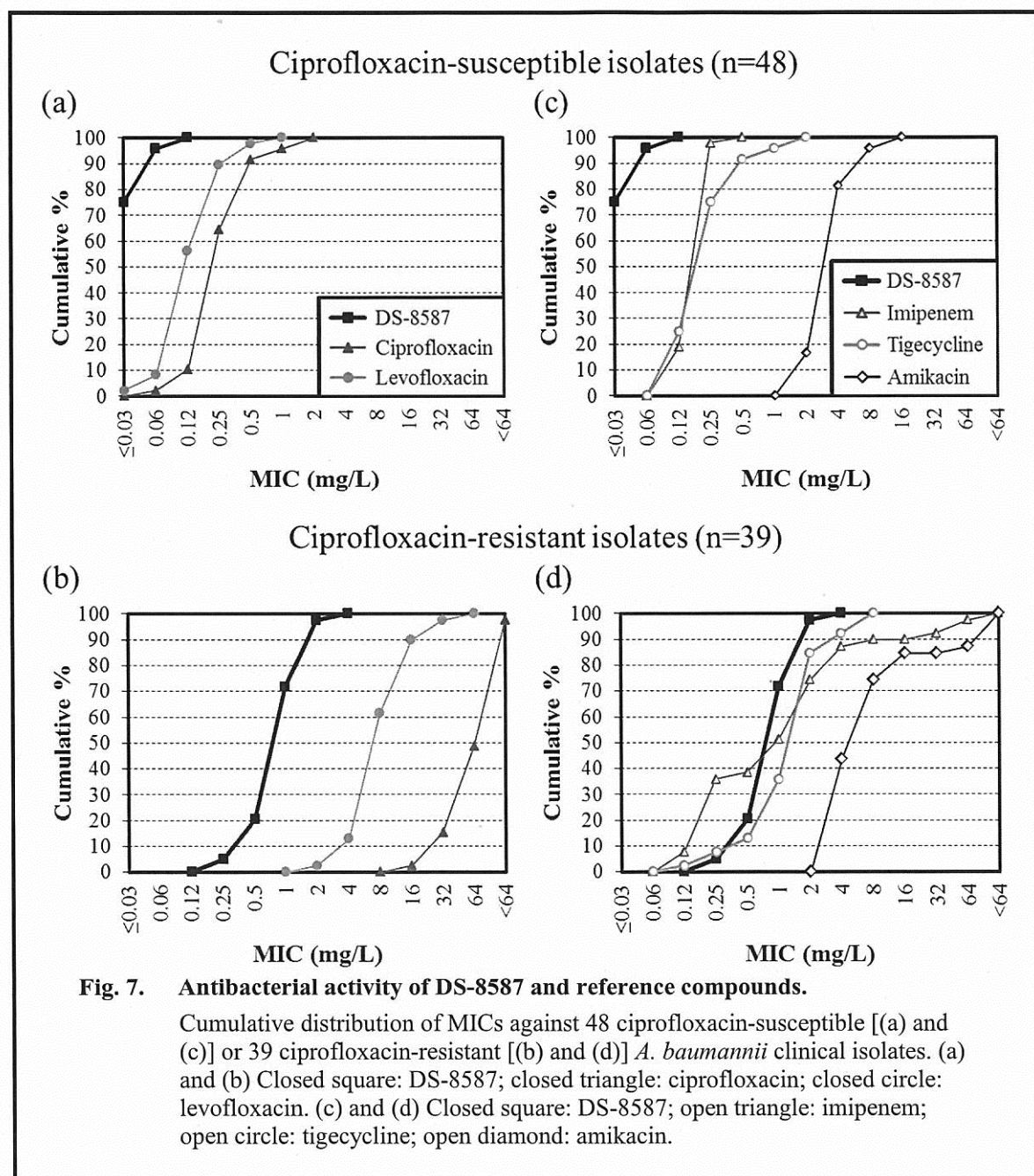
使用菌株を凍結保存ストックより MHA に塗抹し、35°C で一晩培養した。生育した菌を CAMHB に懸濁し、塗抹菌液とした。それを ciprofloxacin あるいは DS-8587 含有 MHA にスパイラルプレーターを用いて 100  $\mu$ l 接種した後、35°C で 40~48 時間培養した。培養液の生菌数 (CFU/ml) は、上記のように測定した。耐性菌出現頻度は、薬物を加えていない培地における生菌数をもとに算出した。また、 $10^{10}$  CFU 接種しても耐性菌が出現しない濃度、すなわち耐性菌出現頻度が  $10^{-11}$  未満になる化合物濃度を MPC とした。



## 結果

### 1. 臨床分離 *A. baumannii* に対する DS-8587 の抗菌活性

*A. baumannii* 87 株の臨床分離株に対する ciprofloxacin の抗菌活性を測定したところ、CLSI に規定された基準に従って ciprofloxacin の MIC が 4 mg/L 以上を ciprofloxacin 耐性と分類すると、87 株のうち 48 株が ciprofloxacin 感受性、39 株が ciprofloxacin 耐性に分類された。48 株の ciprofloxacin 感受性株に対して DS-8587 の抗菌活性を測定したところ、被験菌株の 90% の発育を阻止する濃度



基礎報文 1) の Table 1 および 2) の Figure 1 をまとめた。

(MIC<sub>90</sub>) は 0.06 mg/L であり、ciprofloxacin および levofloxacin の MIC<sub>90</sub> は共に 0.5 mg/L であったことから、ciprofloxacin 感受性株に対して DS-8587 の抗菌力は ciprofloxacin および levofloxacin のそれらよりも 8 倍高いことが分かった (Fig. 7a)。一方、39 株の ciprofloxacin 耐性株に対する DS-8587 の MIC<sub>90</sub> は 2 mg/L であり、ciprofloxacin および levofloxacin の MIC<sub>90</sub> はそれぞれ >64 および 32 mg/L であったことから、ciprofloxacin 耐性株に対して DS-8587 の抗菌力は ciprofloxacin のそれよりも 32 倍以上、levofloxacin のそれよりも 16 倍高かった (Fig. 7b)。他系統抗菌薬では、48 株の ciprofloxacin 感受性株に対する imipenem、amikacin、および tigecycline の MIC<sub>90</sub> はそれぞれ 0.25、8、および 0.5 mg/L (Fig. 7c) であり、39 株の ciprofloxacin 耐性株に対してはそれぞれ 32、>64、および 4 mg/L (Fig. 7d) であった。このことから、DS-8587 は使用したキノロンおよび他系統抗菌薬の中で最も高い活性を示した。

## 2. 多剤耐性 *A. baumannii* に対する DS-8587 の抗菌活性

7 株の多剤耐性 *A. baumannii* に対する DS-8587 の MIC range は 0.25-2 mg/L であり、ciprofloxacin の 16-64 倍、levofloxacin の 8-16 倍、 $\beta$ -lactam 系抗菌薬である imipenem の 8-128 倍、aminoglycoside 系抗菌薬である amikacin の 32 倍以上高い活性を示した (Table 2)。

Table 2. Antibacterial activity of DS-8587 against multi-drug resistant *A. baumannii*.

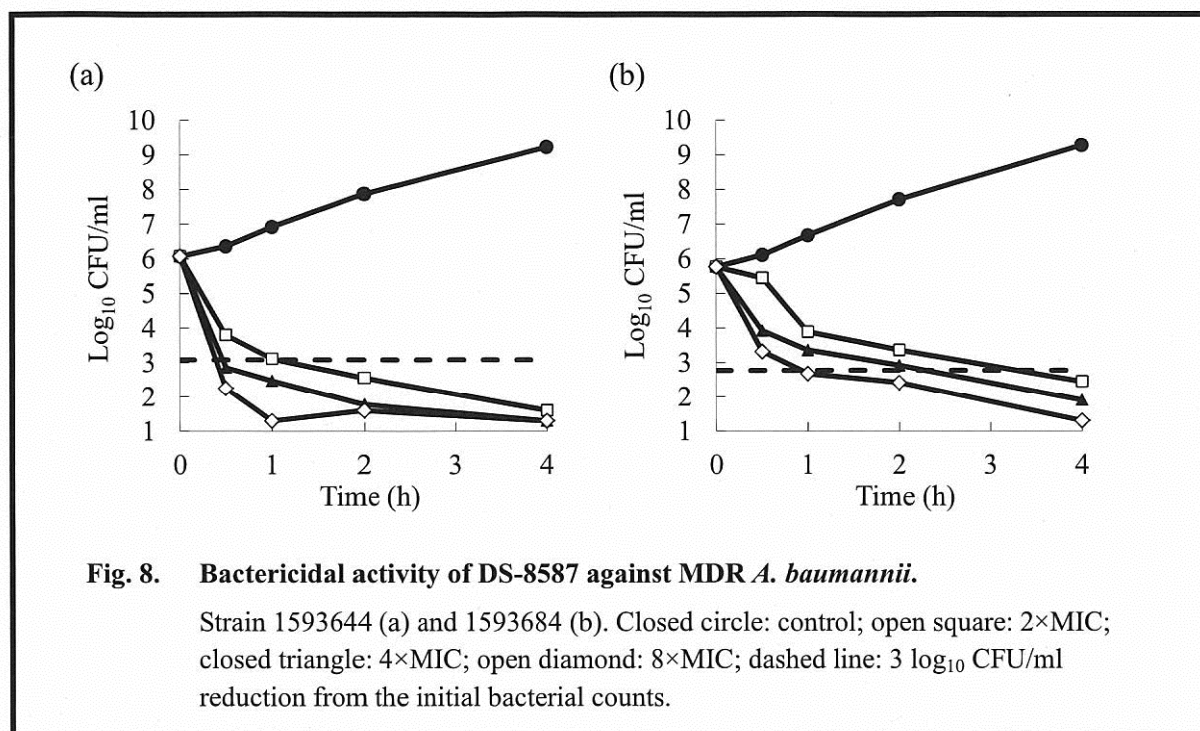
Strain	MIC (mg/L)				
	DS-8587	Ciprofloxacin	Levofloxacin	Imipenem	Amikacin
1593698	0.25	16	4	16	>128
1593684	0.5	8	4	64	>128
1593699	0.5	32	8	32	>128
1593644	1	64	16	32	>128
1593707	1	64	8	16	32
1593686	2	32	16	32	>128
1593655	2	64	16	16	>128

基礎報文 3) の Table 1

## 3. 殺菌活性

多剤耐性 *A. baumannii* 1593644 株および 1593684 株に対する DS-8587 の殺菌活性を検討したところ、濃度および時間依存的な短時間殺菌が認められた (Fig. 8)。3 log<sub>10</sub> CFU/ml 以上の菌数減少が、1593644 株では DS-8587 作用 2 時間で、1593684 株では DS-8587 作用 4 時間で観察された。





基礎報文 3) の Figure 1

#### 4. 耐性菌出現頻度および MPC

DS-8587 および ciprofloxacin に対する *A. baumannii* 19289 株および 19347 株の耐性菌出現頻度を測定したところ (Table 3)、4 倍の MIC 濃度 (4×MIC) 存在下における DS-8587 耐性菌出現頻度は、ciprofloxacin より低かった。また、MPC を判定したところ、DS-8587 は 0.25 および 4 mg/L であり、ciprofloxacin のそれよりも小さい値であった (Table 4)。

**Table 3. The frequency of single-step mutants for DS-8587 and ciprofloxacin in *A. baumannii***

Strain	Compound	MIC (mg/L)	Frequency of spontaneous resistant at 4×MIC
19289	DS-8587	0.015	$4.17 \times 10^{-8}$
	Ciprofloxacin	0.06	$2.39 \times 10^{-6}$
19347	DS-8587	0.12	$7.29 \times 10^{-8}$
	Ciprofloxacin	1	$9.64 \times 10^{-6}$

基礎報文 1) の本文中に記載したデータを表にした。



**Table 4. The MPC for DS-8587 and ciprofloxacin in *A. baumannii*.**

Strain	MPC (mg/L)	
	DS-8587	Ciprofloxacin
19289	0.25 (16)*	2 (32)
19347	4 (32)	32 (32)

\* MPC/MIC ratios are shown in parentheses.

基礎報文 1) の本文中に記載したデータを表にした。

### 考察

DS-8587 は ciprofloxacin 耐性株に対して、同じキノロン系抗菌薬である ciprofloxacin および levofloxacin、あるいは他系統の抗菌薬である imipenem、tigecycline、および amikacin を上回る高い抗菌活性であることを見出した (Fig. 7b, 7d)。また、DS-8587 は多剤耐性 *A. baumannii* に対して MIC range が 0.25-2 mg/L であり、高い活性を示すことが分かった (Table 2)。それぞれの抗菌薬の特長を把握する上で抗菌活性は根幹をなす要素であり、ciprofloxacin 耐性および多剤耐性 *A. baumannii* に対して使用抗菌薬の中で DS-8587 が最も高い活性を示したことは、DS-8587 が *A. baumannii* 感染症治療薬となりうることを示唆する結果である。それを検証するためには、DS-8587 の高い抗菌活性が *in vivo* での抗菌効果に反映されるか確かめることが必要である。また、DS-8587 に対する耐性菌出現頻度は ciprofloxacin のそれよりも低かった (Table 3) ことは、DS-8587 が多剤耐性 *A. baumannii* に対して短時間殺菌活性を示した (Fig. 8) ことに起因すると推察される。DS-8587 は *S. aureus* および *E. coli* に対しても短時間殺菌活性を示し、その被験菌株の DS-8587 に対する耐性菌出現頻度は ciprofloxacin のそれよりも低いことが示されている (39)。今後、耐性菌出現頻度測定に使用した株を用いて DS-8587 および ciprofloxacin の殺菌活性を測定し、結果を比較して耐性菌出現頻度との関連を検証することが必要である。

本章の研究によって、DS-8587 は既存抗菌薬と比べて ciprofloxacin 耐性および多剤耐性 *A. baumannii* に対する活性が高いことが明らかとなった。また、短時間殺菌活性を有し、DS-8587 に対する耐性菌出現頻度が低いことを明らかにした。

## 第2章 キノロン耐性機序による DS-8587 の抗菌活性の変化

### 諸言

臨床分離株の系統解析には、7種類のハウスキーピング遺伝子の塩基配列をもとにした MLST 法 (5) が用いられる。それら塩基配列を Pasteur のデータベース (PF8) と照合することで、sequence type (ST) を同定して系統を解析する。日本の臨床分離 *A. baumannii* では、カルバペネム耐性株について MLST 解析した報告 (40) があるが、キノロン耐性 *A. baumannii* についての報告はない。

第1章における結果から、DS-8587 は臨床分離 ciprofloxacin 耐性および多剤耐性 *A. baumannii* に対して高い抗菌活性を示すことを見出した。このことから、DS-8587 はキノロン耐性機序による抗菌活性の変化が小さいと考えられる。キノロン耐性機序は i) 標的酵素である DNA gyrase あるいは DNA topoisomerase IV の変異による親和性低下、ii) 抗菌薬排出システムの発現亢進、iii) 標的酵素への結合を阻害する Qnr タンパク質の発現、iv) 外膜透過性低下などが挙げられ (41, 42)、*A. baumannii* の場合には、i)~iii) が報告されている (19, 21)。

本章では、臨床分離 *A. baumannii* を MLST 法を用いて ST を同定して系統を解析し、各系統が示すキノロン耐性機序を調べた。次に、それらキノロン耐性機序が DS-8587 の抗菌活性に及ぼす影響について解析した。

### 材料および方法

#### 1. 使用菌株

第1章に記載した臨床分離株を使用した。

#### 2. 使用培地

第1章に記載した培地を使用した。

#### 3. Multilocus sequence typing (MLST) および sequence type (ST) の同定

Diancourt らの方法 (5) に従って、MLST 解析および ST の同定を行った。

#### 4. *gyrA*、*parC*、および *parE* 遺伝子のキノロン耐性決定領域 (quinolone resistance- determining region: QRDR) 変異解析

PCR 法による *gyrA*、*parC*、および *parE* 遺伝子の QRDR の増幅には、臨床分離株のゲノム DNA を鋳型とし、Table 5 に示したプライマーおよび DNA ポリメラーゼとして Platinum Blue PCR SuperMix を用いた。PCR 反応は、94°C で2分間加熱後、98°C で15秒間、60°C で30秒間、72°C で30秒間を1サイクルとした反応を40サイクル、さらに72°C で2分間の反応を加えた条件で行なった。PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit により精製し、PCR 反応と同じプライマーを添加してシーケンスを解析し、塩基配列を決定した。その塩基配列および対応するアミノ酸配列を



*A. baumannii* ATCC 17978 株の各遺伝子のそれらと比較することで変異箇所を同定した。

#### 5. *adeS/adeR/adeA/adeB/adeC* および *adeL/adeF/adeG/adeH* 遺伝子の検出

PCR 法による *adeS/adeR/adeA/adeB/adeC* および *adeL/adeF/adeG/adeH* 遺伝子の検出は、臨床分離株のゲノム DNA を鋳型とし、Table 5 に示したプライマーおよび DNA ポリメラーゼとして Platinum Blue PCR SuperMix を用いた。PCR 反応は、94°C で 2 分間加熱後、98°C で 15 秒間、55°C (*adeL*、*adeF*)、64°C (*adeS*)、65°C (*adeB*、*adeC*、*adeG*、*adeH*)、70°C (*adeR*)、あるいは 72°C (*adeA*) で 20 秒間、72°C で 45 秒間を 1 サイクルとした反応を 40 サイクル、さらに 72°C で 2 分間の反応を加えた条件で行なった。

#### 6. 使用抗菌薬

第 1 章に記載した抗菌薬を使用した。

#### 7. 抗菌薬排出システム阻害薬と調製

抗菌薬排出システム阻害薬として 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) (43) (Sigma-Aldrich Japan K.K.) を使用した。ジメチルスルホキシドによって溶解し、実験に使用した。

#### 8. MIC 測定

第 1 章に記載した材料および方法の項と同様に行った。但し、NMP 添加時の抗菌活性測定には、終濃度が 100 mg/L となるように NMP を添加した CAMHB を用いた。

#### 9. *qnr* 遺伝子の検出

Cattoir らの方法 (44) に従って、PCR 法によって *qnr* 遺伝子の有無を調べた。

#### 10. リコンビナント *A. baumannii* DNA gyrase および DNA topoisomerase IV タンパク質の精製

##### a) リコンビナントタンパク質発現ベクターの構築

PCR 法による *gyrA*、*gyrB*、*parC*、および *parE* 遺伝子の増幅には、*A. baumannii* ATCC 19606 株のゲノム DNA を鋳型とし、*NdeI* あるいは *SapI* の制限酵素認識配列を付加したプライマー (Table 5) および DNA ポリメラーゼとして *Pfx50* DNA Polymerase (Invitrogen) を用いた。PCR 反応は、94°C で 15 秒間、65°C で 30 秒間、72°C で 3 分間を 1 サイクルとした反応を 20 サイクル、さらに 72°C で 5 分間の反応を加えた条件で行った。PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit により精製して塩基配列を解析し、その塩基配列から対応するアミノ酸配列を *A. baumannii* ATCC 17978 株の各アミノ酸配列と比較して一致することを確認した。増幅した *gyrA* および *parE* 遺伝子は *NdeI* [New England Biolabs (NEB)]、*parC* 遺伝子は *NdeI* および *SapI* (NEB)、*gyrB* 遺伝子は *SapI* で制限酵素処理し、pTYB1 fusion protein expression vector (NEB) とライゲーションすることで C 末端に Intein-tag を融合した GyrA-Intein、GyrB-Intein、ParC-Intein、および ParE-Intein タンパク質発現プラスミド pTYB1-*gyrA*、pTYB1-*gyrB*、pTYB1-*parC*、および pTYB1-*parE* を構築した。変異型 GyrA

(Ser81 位 Leu 変異体)あるいは変異 ParC (Ser84 位 Leu 変異体) 発現ベクターは、Table 5 に示すプライマー、pTYB1-*gyrA* および pTYB1-*parC* を用い、KOD -Plus- Mutagenesis Kit (Toyobo) を用いて添付マニュアルに従って変異 *GyrA* および ParC 発現プラスミド pTYB1-mut *gyrA* および pTYB1-mut *parC* を構築した。

b) *E. coli* へのプラスミドの導入

Z-Competent *E. coli* Transformation Kit (Zymo Research) を用いて添付マニュアルに従い作製した *E. coli* BL21 (DE3) 株のコンピテントセルと、上記のように構築した pTYB1-*gyrA*、pTYB1-*gyrB*、pTYB1-*parC*、あるいは pTYB1-*parE* を混合し、氷上で 10 分静置した。その混合液を終濃度 100 mg/L となるようにアンピシリンを加えた LB agar に塗抹し、37°C で一晩培養して形質転換した *E. coli* BL21 (DE3) 株を得た。

c) リコンビナントタンパク質の生産および精製

各形質転換株を凍結保存ストックより、アンピシリンを終濃度 100 mg/L となるように加えた LB broth に接種し、37°C で一晩振盪培養した後、同じくアンピシリンを終濃度 100 mg/L となるように加えた LB broth に接種し、OD<sub>600</sub> が 0.5 程度になるまで 37°C で振盪培養した。培養液に isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG; Wako) を終濃度 0.5 mM となるように添加し、さらに 30°C で 2 時間振盪培養したのち、遠心分離 (7,000×g, 5 分間, 4°C) により得られた菌体を lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, および proteinase inhibitor) で懸濁した。超音波処理によって菌体を破碎した後、未破碎の菌体を遠心分離 (15,000×g, 30 分間, 4°C) により除去して上清を得た。その上清を洗浄バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, および 1 mM EDTA) で平衡化した Chitin Beads (NEB) を充填したカラムに加え、洗浄バッファーで洗浄した。その後に cleavage buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, および 50 mM DTT) を加えて 4°C で 20 時間培養することで目的のタンパク質から intein-tag を切断した。溶出画分を回収し、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)-50% glycerol-1 mM DTT-1 mM EDTA で 4°C で 16 時間透析することで、*GyrA*、変異型 *GyrA*、*GyrB*、*ParC*、変異型 *ParC*、および *ParE* タンパク質を得た。

## 11. DNA gyrase および DNA topoisomerase IV 阻害試験

a) DNA gyrase および DNA topoisomerase IV の再構成

DNA gyrase および DNA topoisomerase IV を再構成させるため、上記で精製したリコンビナントサブユニットを混合し、氷上で 30 分静置した。

b) DNA gyrase supercoiling assay

1 unit (0.2 μg の弛緩型 pBR322 を 37°C、30 分で supercoiled に変換する酵素量) の再構成 DNA gyrase、0.2 μg の弛緩型 pBR322 (TopoGEN, Inc., USA)、および調製したキノロン (DS-8587, ciprofloxacin, および levofloxacin) を incubation buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 40 mM KCl, 2 mM



MgCl<sub>2</sub>, 1 mM spermidine (Fluka, Switzerland), 1 mM DTT, 4 mM ATP, 0.02 mg/ml BSA] 中で計 20 µl の反応系で 37°C で 30 分間反応させた。その後、1.2 µl の停止溶液 [5% N-Lauroylsarcosine sodium salt (Sigma-Aldrich Japan K.K.), 0.025% bromophenol blue (Nacalai Tesque, Inc.), および 25% glycerol] を加えることで反応を停止させた。

c) DNA topoisomerase IV decatenation assay

1 unit (0.2 µg の kinetoplast DNA を 37°C、30 分で monomer に変換する酵素量) の再構成 DNA topoisomerase IV、10 mM Tris-HCl (pH 7.5) で調製した 0.2 µg の kinetoplast DNA (TopoGEN, Inc.), および調製したキノロン (DS-8587, ciprofloxacin, および levofloxacin) を incubation buffer [39 mM Tris-HCl (pH 7.5), 62.4 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM ATP, および 0.05 mg/ml BSA] 中で計 20 µl の反応系で 37°C で 30 分間反応させた。その後、1.2 µl の停止溶液を加えて反応を停止させた。

d) DNA gyrase および DNA topoisomerase IV 阻害濃度の算出

Agarose 1600 (和光純薬工業) を TEAS バッファー [50 mM Tris-HCl (pH 8.1), 2 mM EDTA, 20 mM sodium acetate, および 18.5 mM NaCl] で終濃度 0.7% となるように溶解した。作製した 0.7% アガロースゲルで 15 µl の反応溶液を 50V の条件下で 1.5 時間電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、Gel Print 2000i/VGA を用いて検出した。Supercoiling assay では supercoiled DNA を、decatenation assay では monomer DNA のバンド強度を Intelligent Quantifier version 3.1 (Bio Image Systems Inc., UK) で定量することにより、キノロン薬非添加群と比較して 50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した。IC<sub>50</sub> の算出には SAS System Release 8.2 (SAS Institute Inc.) を用いた。

## 12. 自然耐性株の分離

*A. baumannii* ATCC 19606 株を凍結保存ストックより ciprofloxacin および norfloxacin をそれぞれ終濃度 4 および 16 mg/L となるように添加した MHA に塗抹し、35°C で 48 時間培養して生育したコロニーを取得した。また、*A. baumannii* 19483 株を凍結保存ストックより tigecycline を終濃度 2 mg/L となるように添加した MHA に塗抹し、35°C で 24 時間培養して生育したコロニーを取得した。

## 13. 定量的リアルタイム RT-PCR による *adeB* および *abeM* 遺伝子発現量の測定

前項で取得した tigecycline あるいは norfloxacin 耐性菌から、添付マニュアルに従い total RNA を TRIzol Reagent (Invitrogen) を用いて抽出した。抽出した total RNA 中に混入した DNA を取り除くため、添付マニュアルに従い TURBO DNA-free (Ambion) で DNase 処理を行なった。次に、TaKaRa RNA PCR (AMV) kit Ver. 3.0 (Takara) を用いて添付マニュアルに従い cDNA を合成した。定量的リアルタイム RT-PCR は Mx4000 (Stratagene) で実施した。また、各サンプル間の RNA 量の標準化のために *rpoB* 遺伝子の発現量を測定した。*adeB* および *abeM* 遺伝子の定量的 RT-PCR は、Table 5 に示した各プライマーおよび Fast SYBR Green Master Mix (Life technologies) を用いて、95°C で

20 秒間加熱後、95°C で 3 秒間、60°C で 30 秒間を 1 サイクルとした反応を 40 サイクルの条件で実施した。*rpoB* 発現量を内部標準とした相対的な *adeB* および *abeM* 遺伝子発現量を、比較 CT 法により算出した。

#### 14. *abeM* 欠損株の作製

##### a) 相同組換え用プラスミドの構築

PCR 法による *abeM* 5'領域の 544 bp (*abeM*-L; position: 38 to 581) および *abeM* 3'領域の 424 bp (*abeM*-R; position: 720 to 1143) の増幅には *A. baumannii* ATCC 19606 株ゲノム DNA を鋳型として、同じくゲンタマイシン耐性遺伝子 (*Gen<sup>R</sup>*) の増幅には *P. aeruginosa* PAM1626 株 (45) ゲノム DNA を鋳型として、Table 5 に示した各プライマーおよび DNA ポリメラーゼとして Expand High-Fidelity PCR System を用いた。*abeM*-L および *abeM*-R を増幅するための PCR 反応は、94°C で 5 分間加熱後、98°C で 15 秒間、60°C で 20 秒間、72°C で 1 分間を 1 サイクルとした反応を 25 サイクル、さらに 72°C で 2 分間の反応を加えた条件で行なった。一方、*Gen<sup>R</sup>* を増幅するための PCR 反応は、94°C で 5 分間加熱後、98°C で 15 秒間、60°C で 20 秒間、72°C で 1 分間を 1 サイクルとした反応を 20 サイクル、さらに 72°C で 2 分間の反応を加えた条件で行なった。増幅後の DNA 断片を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製した。精製した *Gen<sup>R</sup>* を pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) へ TA クローニングすることにより pCR 2.1-TOPO/*Gen<sup>R</sup>* を構築した。次に増幅した *abeM*-L 断片を *Hind* III (NEB) および *Bam* HI (NEB) で制限酵素処理することにより、同じ制限酵素で処理した pCR 2.1-TOPO/*Gen<sup>R</sup>* とライゲーションすることで、pCR 2.1-TOPO/*abeM*-L/*Gen<sup>R</sup>* を構築した。また、増幅した *abeM*-R 断片を *Xho* I (NEB) および *Xba* I (NEB) で制限酵素処理することにより、同じ酵素で処理した pCR 2.1-TOPO/*abeM*-L/*Gen<sup>R</sup>* とライゲーションすることで、pCR 2.1-TOPO/*abeM*-L/*Gen<sup>R</sup>*/ *abeM*-R を構築した。PCR 法による *abeM*-L/*Gen<sup>R</sup>*/ *abeM*-R 断片の増幅には、構築した pCR 2.1-TOPO/*abeM*-L/*Gen<sup>R</sup>*/ *abeM*-R を鋳型として、Table 5 に示したプライマーおよび DNA ポリメラーゼとして *Pfx50* DNA polymerase を用いた。PCR 反応は、94°C で 5 分間加熱後、15 秒間、60°C で 30 秒間、68°C で 3 分間を 1 サイクルとした反応を 30 サイクル、さらに 68°C で 5 分間の反応を加えた条件で行ない、増幅後の DNA 断片を QIAquick PCR Purification Kit で精製した。増幅した *abeM*-L/*Gen<sup>R</sup>*/ *abeM*-R 断片を *Sma* I (NEB) で制限酵素処理し、同じく *Sma* I 処理した pEX100T とライゲーションすることで、pSH001 を構築した。構築したプラスミドは *E. coli* S17-1 株 (46) に導入した。

##### b) 相同組換えによる遺伝子欠損株の作製

pSH001 を導入した *E. coli* S17-1 株と *A. baumannii* ATCC 19606 株由来 norfloxacin 耐性菌を混和し、MHA 上にスポットして 37°C で 5 時間培養した。増殖した菌体を白金耳でかき集め、LB broth に懸濁した。その懸濁液をゲンタマイシン (終濃度 50 mg/L) およびクロラムフェニコール (終濃度 30 mg/L) 含有 MHA に塗抹し、37°C で 3 日間培養した。出現したコロニーをゲンタマイシン (終濃度 50 mg/L) およびクロラムフェニコール (終濃度 30 mg/L) 含有 CAMHB に接種し、37°C で一晩振盪培養した。その菌液をゲンタマイシン (終濃度 50 mg/L) および 10% ショ糖含有 LB agar



**Table 5. Primer used in this section**

Target gene	Primer	Sequence (5' - 3')
Detection and sequencing analysis of <i>gyrA</i> , <i>parC</i> , and <i>parE</i> genes		
<i>gyrA</i>	Ab GyrA-1	AGGAGTACATATGAGCGTATCGGAAATCCG
	Ab GyrA-4	GCAATACCCGCAGCACCGTTAATTAACA
<i>parC</i>	Ab ParC-1	TAAGCTGCATATGACCAGCCTTGCGC
	Ab ParC-4	CCATCAAAGTTATCTTGCCATTTCGC
<i>ParE</i>	Ab ParE-F1	CTCTTTATTGTTGAGGGTGACTCTG
	Ab ParE-R1	ACGTAGTTGAATTGCGTTCATCTC
Gene amplification of <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> , and <i>parE</i> genes		
<i>gyrA</i>	Ab GyrA-1 ( <i>Nde</i> I)	AGGAGTACATATGAGCGTATCGGAAATCCG
	Ab GyrA-2	GAAGATACTTCTGAAGAG
<i>gyrB</i>	Ab GyrB-1	TGAGTTCAGAGTCTCAATCAGCC
	Ab GyrB-2 ( <i>Sap</i> I)	GAATCTT <u>GCTCTTCCG</u> CAAGCATCAATATCCGC
<i>parC</i>	Ab ParC-1 ( <i>Nde</i> I)	TAAGCTGCATATGACCAGCCTTGCGC
	Ab ParC-2 ( <i>Sap</i> I)	TGCCAGAG <u>GCTCTTCCG</u> CATCCCTGAATCAACAGTT
<i>parE</i>	Ab ParE-1 ( <i>Nde</i> I)	AACGTACCATATGACACAATATACGGCTC
	Ab ParE-2	AACCGTAATATCAGCTAAGTTACCCTTCTGC
<i>in vitro</i> mutagenesis of <i>gyrA</i> and <i>parC</i> genes		
<i>gyrA</i>	Ab_GyrA S81L-F	TAGCTGTTTATGAAACCATTTGTTTCGTATGGC
	Ab_GyrA S81L-R	AGTCACCATGCGGGTGATATTTACCG
<i>parC</i>	Ab_ParC S84L-F	TGGCATGTTATGAAGCCATGG
	Ab_ParC S84L-R	AGTCACCATGTGGGTGGTATTTACC
Detection of <i>adeS/adeR/adeA/adeB/adeC</i> and <i>adeL/adeF/adeG/adeH</i> genes		
<i>adeS</i>	Ab_AdeS_F	TAGTCACGGCGACCTCTCTGCT
	Ab_AdeS_R	AATGCCGGGGCCTTCATCCT
<i>adeR</i>	Ab_AdeR_F	CGCATAGGTGCAGATGACTTTGTGGTGA
	Ab_AdeR_R	CGCTCTAGTGCATCGCTATCATTTCATGCAG
<i>adeA</i>	Ab_AdeA_F	TACGGCGGAAATCCGTCCGCAAGT
	Ab_AdeA_R	CCAATACGCCAGAAATAGGCGCTCGAA
<i>adeB</i>	Ab_AdeB_F	GCGACAACAGATACCTCCGGTACA
	Ab_AdeB_R	TCGGGTCGACCCAAATACGCATAG
<i>adeC</i>	Ab_AdeC_F	CCGTGATTTACGGACTGCTACGCT
	Ab_AdeC_R	CGCTGAGCGTCTAATCGTTCACCA
<i>adeL</i>	Ab_adeL-F	CCACAAAGTCCCAATCGAAGTTGCGT
	Ab_adeL-R	GCCAAGAGGTCAGCTTCGTATTGATGTG
<i>adeF</i>	Ab_adeF-F	CCTCGTCCTTTTGAAGCAGAACTGAACC
	Ab_adeF-R	TGTAACAGGGTCACCCGGACGAA
<i>adeG</i>	Ab_adeG-F	CAGGTGCTGGTTGACAGCTGGAGA
	Ab_adeG-R	GAACGTAAAAGGCCGGGGTGAGGA
<i>adeH</i>	Ab_adeH-F	GCAGCTCAAGCTGAACGCTTACC
	Ab_adeH-R	TGTTCTGCACTGGCTCTGTTACGAG

An engineered restriction site is underlined.

(Continued) Table 5. Primer used in this section

Target gene	Primer	Sequence (5' - 3')
Quantitative real-time PCR for <i>adeB</i> , <i>abeM</i> , and <i>rpoB</i>		
<i>adeB</i>	qadeB-F2	GCCTGCTTTATTGGCTGCTC
	qadeB-R2	GGCAACCCTTCATTCCAAAC
<i>abeM</i>	qAbeM-F	TCAAGCAGGGTTCGGGTTA
	qAbeM-R	TCGGCAACTAATGGTGTGGT
<i>rpoB</i>	qrpoB-F	TGCGCGTTCAACTGGTTCT
	qrpoB-R	TGCCCACACTTCCATCTCAC
Construction of plasmid for deletion of <i>abeM</i>		
<i>abeM</i>	Ab_abeM-1 ( <i>Hind</i> III)	<u>CCCAAGCTT</u> GGTTCGGGTTAATTGATACC
	Ab_abeM-2 ( <i>Bam</i> HI)	CGCG <u>GATCC</u> GCTAACGTAATGAGCATCAG
	Ab_abeM-3 ( <i>Xho</i> I)	CCGCTCGAGTTT <u>TTAGT</u> ACAGGGGCATTGG
	Ab_abeM-4 ( <i>Xba</i> I)	GCTCTAGACCAATACGCCATTAAGGTGA
Gen <sup>R</sup>	GmF2	GCGCCT CATATG CGAATTGACATAAGCCTGTTTCG
	GmR	GCCGAT CTCGAG TTGAACGAATTGTTAGG
Confirmation for deletion of <i>abeM</i>		
<i>abeM</i>	Ab_abeM-F-2	ATGGCAACGGTTTCTAGGTGGAGT
	Ab_abeM-Reverse	CGTAATGCTCGGACAGTGTCTTC

An engineered restriction site is underlined.

基礎報文 1) の Table 1、 2) の Table 3 をまとめた。

に塗抹し、37°Cで一晩培養した。PCR法による*abeM*遺伝子の検出は、生育したコロニーのゲノムDNAを鋳型とし、対象遺伝子の前後300 bp領域に設計されたプライマー (Table 5) および DNAポリメラーゼとして Platinum Blue PCR SuperMix を用いた。PCR反応は、94°Cで5分間加熱後、15秒間、62°Cで20秒間、72°Cで2.5分間を1サイクルとした反応を35サイクル、さらに72°Cで5分間の反応を加えた条件で行なった。

## 結果

### 1. MLST 解析

MLSTによって臨床分離株の系統を解析したところ、42株の ciprofloxacin 感受性株では ST-33 が7株 (16.7%)、ST-213 が5株 (11.9%)、ST-221 が4株 (9.5%)、ST-138 が3株 (7.1%)、ST-32 および ST-34 がそれぞれ2株 (4.8%) であった (Table 6)。一方、31株の ciprofloxacin 耐性株では ST-2 が22株 (71.0%)、ST-25、ST-103、および ST-164 がそれぞれ2株 (6.5%) であることが分かった (Table 6)。今回の検討で、4種の遺伝子型 (allele) (*fusA*-48、*fusA*-49、*rplB*-31、*rpoB*-51) および13種の ST を新たに同定した。



## 2. *gyrA*、*parC*、および *parE* 遺伝子の変異箇所の同定

臨床分離株のキノロンの標的酵素である *gyrA* および *parC* 遺伝子のキノロン耐性決定領域 (quinolone resistance- determining region: QRDR) 変異について解析したところ、42 株の ciprofloxacin 感受性株では変異が認められなかったが、31 株の ciprofloxacin 耐性株すべてにおいて *gyrA* 単独あるいは *gyrA* および *parC* の両方に変異が認められた (Table 6)。ciprofloxacin 耐性株のすべてで、GyrA の 81 位 Ser (TCA) が Leu (TTA) に変異していた。また、ParC では 23 株 (74.2%) で 84 位 Ser (TCG) が Leu (TTG) に、2 株で同 Ser が Tyr (TAT) に、5 株で 88 位 Glu (GAA) が Lys (AAA) に変異が認められた。*gyrA* 単独変異株について *parE* の QRDR 変異を解析したところ、ParE の 458 位 Ser (TCT) が Thr (ACT) に変異していることが分かった。

## 3. 抗菌薬排出システム遺伝子の検出

臨床分離株が抗菌薬排出システム遺伝子である *adeA*、*adeB*、および *adeC* と、その調節因子である *adeS* および *adeR* 遺伝子を保有するか解析したところ、42 株の ciprofloxacin 感受性株の中で 5 遺伝子全てを保有するのは 2 株 (4.8%) であり、4 遺伝子 (*adeS*、*adeR*、*adeA*、および *adeB*) を保有するのは 17 株 (40.5%)、3 遺伝子 (*adeR*、*adeA*、および *adeB*) を保有するのは 2 株 (4.8%)、*adeB* あるいは *adeC* の 1 遺伝子のみを検出したのは 4 株 (9.5%)、5 種全て検出できなかったのは 17 株 (40.5%) であった (Table 6)。一方、31 株の ciprofloxacin 耐性株の中で 5 遺伝子全てを保有するのは 23 株 (74.2%) であり、4 遺伝子 (*adeS*、*adeR*、*adeA*、*adeB*) を保有するのは 7 株 (22.6%)、5 種全て検出できなかったのは 1 株 (3.2%) であった (Table 6)。また、4 株の ciprofloxacin 耐性株で insertion sequence である IS*AbaI* が *adeS* に挿入されていることが判明した。

同じく抗菌薬排出システム遺伝子である *adeF*、*adeG*、*adeH*、およびその調節因子である *adeL* 遺伝子について解析したところ、42 株の ciprofloxacin 感受性株の中で 36 株 (85.7%) が、31 株の ciprofloxacin 耐性株の中で 29 株 (93.5%) が 4 遺伝子全てを保有していた (data not shown)。また、1 株の ciprofloxacin 耐性株で IS*AbaI* が *adeG* に挿入されていることが判明した (Table 6)。

## 4. DS-8587 の抗菌薬排出システム阻害薬併用時の抗菌活性

臨床分離株を用い、抗菌薬排出システム阻害薬として知られている NMP (43) 併用時の DS-8587 および対照薬である ciprofloxacin の抗菌活性を測定したところ、DS-8587 と比較して ciprofloxacin では MIC が低下する株が多く認められた (Fig. 9a, 9b)。42 株の ciprofloxacin 感受性株の場合、NMP 併用により MIC が 4 倍以上低下したのは ciprofloxacin では 5 株であったのに対し、DS-8587 では 1 株であった。また、31 株の ciprofloxacin 耐性株の中では、ciprofloxacin では 7 株、DS-8587 では 3 株であった (Fig. 9c)。このことから、臨床分離株において DS-8587 は ciprofloxacin と比べて抗菌薬排出システムの影響を受けにくいことが分かった。

## 5. *qnrA*、*qnrB*、および *qnrS* 遺伝子の検出

臨床分離株が *qnrA*、*qnrB*、および *qnrS* 遺伝子を保有するか解析したところ、使用した 73 株の臨床分離株すべてにおいて検出されなかった (data not shown)。

**Table 6. Epidemiological and molecular features of 73 *A. baumannii* clinical isolates.**

ST	No. of isolates	MLST allelic profile							Distribution of <i>adeSRABC</i> genes					Mutation	
		<i>cpn60</i>	<i>fusA</i>	<i>gltA</i>	<i>pyrG</i>	<i>recA</i>	<i>rplB</i>	<i>rpoB</i>	<i>adeS</i>	<i>adeR</i>	<i>adeA</i>	<i>adeB</i>	<i>adeC</i>	GyrA	ParC
Ciprofloxacin- susceptible (n=42)															
ST-10	1	1	3	2	1	4	4	4	-	-	-	-	+	wt	wt
ST-25	1	3	3	2	4	7	2	4	+	+	+	+	-	wt	wt
ST-32	2	1	1	2	2	3	4	4	+	+	+	+	-	wt	wt
ST-33	7	3	5	7	1	7	1	4	-	-	-	-	-	wt	wt
ST-34	2	8	1	14	3	12	1	13	-	-	-	-	-	wt	wt
ST-40	1	1	2	2	2	5	1	14	+	+	+	+	+	wt	wt
ST-109	1	26	4	2	2	9	1	5	+	+	+	+	-	wt	wt
ST-118	1	35	2	11	2	9	1	2	+	+	+	+	-	wt	wt
ST-130	1	8	1	14	3	12	1	5	-	-	-	-	-	wt	wt
ST-138	2								+	+	+	+	-	wt	wt
	1	3	3	7	26	7	1	4	-	-	-	+	-	wt	wt
ST-151	1	27	5	7	1	7	1	4	-	-	-	-	-	wt	wt
ST-213	5	3	3	7	1	7	1	4	-	-	-	-	-	wt	wt
ST-218	1	1	5	40	2	7	1	1	+	+	+	+	-	wt	wt
ST-221	3								+	+	+	+	-	wt	wt
	1	3	1	2	1	18	1	48	-	+	+	+	-	wt	wt
ST-235	1	3	5	7	1	7	1	2	-	-	-	-	-	wt	wt
ST-236	1	3	2	7	26	7	1	4	-	-	-	+	-	wt	wt
ST-237	1	3	5	7	26	7	1	4	-	-	-	+	-	wt	wt
ST-238	1	6	3	8	2	3	5	4	+	+	+	+	-	wt	wt



ST-239	1	1	4	2	2	7	1	4	+	+	+	+	-	wt	wt
ST-240	1	3	3	2	5	7	2	51	-	+	+	+	-	wt	wt
ST-241	1	40	3	15	2	40	4	4	+	+	+	+	-	wt	wt
ST-242	1	1	48	40	2	7	4	9	+	+	+	+	-	wt	wt
ST-243	1	3	3	2	2	9	2	4	+	+	+	+	-	wt	wt
ST-244	1	8	1	5	3	7	1	16	+	+	+	+	-	wt	wt
ST-245	1	3	2	2	2	4	1	4	+	+	+	+	+	wt	wt

Ciprofloxacin-resistant (n=31)

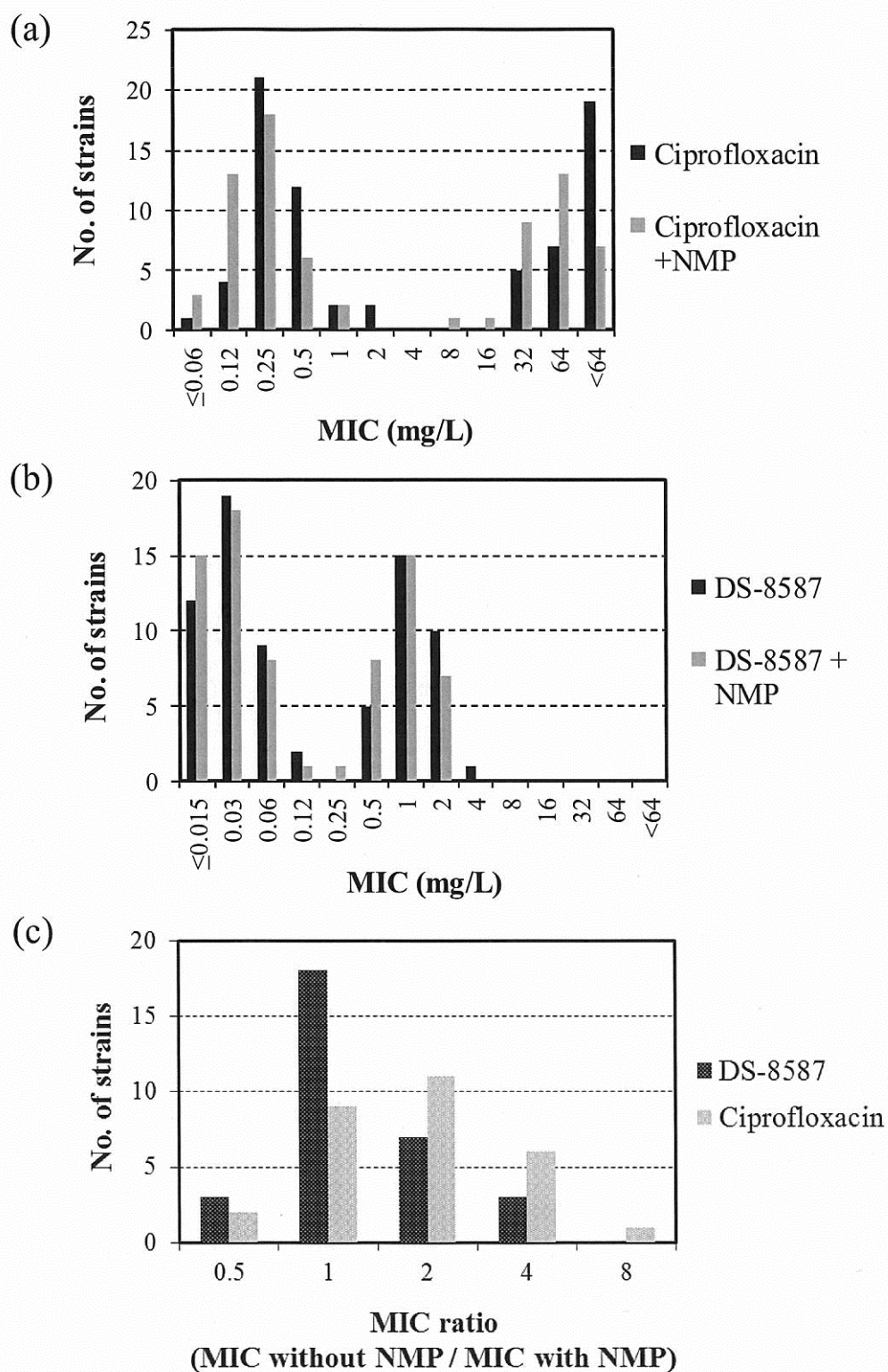
ST-2*#	22	2	2	2	2	2	2	2	+	+	+	+	+	Ser81Leu (n=22)	Ser84Leu (n=17), Glu88Lys (n=5)
ST-25*	2	3	3	2	4	7	2	4	+	+	+	+	-	Ser81Leu (n=2)	Ser84Leu (n=2)
ST-103	2	7	3	2	1	7	1	4	+	+	+	+	-	Ser81Leu (n=2)	Ser84Tyr (n=2)
ST-149	1	3	12	11	2	14	9	14	+	+	+	+	-	Ser81Leu	Ser84Leu
ST-164	2	40	3	7	2	40	4	4	+	+	+	+	-	Ser81Leu (n=2)	Ser84Leu (n=2)
ST-246**	1	1	49	3	4	5	2	36	-	-	-	-	-	Ser81Leu	wt
ST-247	1	2	2	2	2	2	31	2	+	+	+	+	+	Ser81Leu	Ser84Leu

\* Three ST-2 isolates and one ST-25 isolate: IS*AbaI* was inserted into *adeS*.

# One ST-2 isolate: IS*AbaI* was inserted into *adeG*.

\*\* The Ser458Thr substitution was found in *parE*.

基礎報文 2) の Table 2



**Fig. 9.** MICs against *A. baumannii* clinical isolates with and without the addition of the efflux pump inhibitor 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP).

a) ciprofloxacin, b) DS-8587: black bar; without NMP, shaded bar; with NMP.

c) MIC ratio (MIC without NMP/MIC with NMP) for ciprofloxacin resistant strains



## 6. GyrA 81 位および ParC 84 位変異による DS-8587 の標的酵素阻害活性の変化

臨床分離株の *gyrA* および *parC* の QRDR の変異を解析した結果から、GyrA の 81 位 Ser および ParC の 84 位 Ser の変異が多く認められた (Table 6)。この変異による DS-8587 の活性変化を調べるため、野生型および変異型 DNA gyrase あるいは DNA topoisomerase IV に対する阻害活性を測定したところ、野生型 DNA gyrase に対する DS-8587 の IC<sub>50</sub> は、ciprofloxacin の 4.9 倍、levofloxacin の 3.7 倍小さく、GyrA の 81 位 Ser が Leu に変異した DNA gyrase に対する DS-8587 の IC<sub>50</sub> は、ciprofloxacin の 8.4 倍、levofloxacin の 7.8 倍小さいことが分かった (Table 7)。また、野生型 DNA topoisomerase IV に対する DS-8587 の IC<sub>50</sub> は、ciprofloxacin の 2.1 倍、levofloxacin の 3.2 倍小さく、ParC の 84 位 Ser が Leu に変異した DNA topoisomerase IV に対する DS-8587 の IC<sub>50</sub> は、ciprofloxacin の 5.6 倍、levofloxacin の 7.5 倍小さいことが分かった (Table 7)。以上の結果から、DS-8587 は levofloxacin および ciprofloxacin より高い阻害活性を示し、DS-8587 と levofloxacin および ciprofloxacin との活性差は、野生型より変異型の方が大きかった。

**Table 7. Inhibitory activity of DS-8587 and comparators against the wild-type and altered *A. baumannii* target enzymes.**

Compound	IC <sub>50</sub> (mg/L)			
	DNA gyrase		DNA topoisomerase IV	
	Wild-type	Ser81Leu (GyrA)	Wild-type	Ser84Leu (ParC)
DS-8587	1.06	10.02	1.70	5.81
Ciprofloxacin	5.16	84.14	3.51	32.34
Levofloxacin	3.95	78.45	5.51	43.59

基礎報文 1) の Table 2

## 7. GyrA 81 位変異による DS-8587 の抗菌活性の変化

標的酵素阻害試験の結果から、DS-8587 は GyrA 81 位あるいは ParC 84 位が変異した標的酵素に対しても高い阻害活性を有し、ciprofloxacin や levofloxacin と比べてその変異の影響を受ける程度が小さいことが判明した (Table 7)。この高い阻害活性が抗菌活性に反映されるかを調べるため、*A. baumannii* ATCC 19606 株から ciprofloxacin 耐性株を分離したところ、GyrA では Ser81 位が Leu に変異し、ParC では QRDR に変異が認められなかった (data not shown)。親株である ATCC 19606 株およびその分離した GyrA 変異株 (CIP-4 株) に対する抗菌活性を測定したところ、ciprofloxacin の MIC はそれぞれ 1 および 32 mg/L であり、32 倍活性が低下することが分かった (Table 8)。一方、Levofloxacin では 16 倍活性が低下したが、DS-8587 では 8 倍の活性低下であった。

## 8. 抗菌薬排出システムによる DS-8587 の抗菌活性の変化

臨床分離株に対する NMP 併用時の DS-8587 の抗菌活性の変化は、ciprofloxacin と比べて小さい

**Table 8. Antibacterial activity against isogenic *gyrA* mutant of *A. baumannii*.**

Strain	Mutation <i>gyrA</i>	MIC (mg/L)		
		DS-8587	Ciprofloxacin	Levofloxacin
ATCC 19606 (Parent Strain)	-	0.12	1	0.5
CIP-4*	Ser81Leu	1 (8)**	32 (32)	8 (16)

\*No amino acid changes in the QRDR of *parC*.

\*\*MIC ratios (CIP-4/ATCC 19606) are shown in parentheses.

基礎報文 1) の本文中に記載したデータを表にした。

ことが判明した (Fig. 9c)。そこで、抗菌薬排出システムである AdeABC および AbeM が DS-8587 の抗菌活性に及ぼす影響を調べるため、tigecycline および norfloxacin 耐性株に対する抗菌活性を測定した。*A. baumannii* 19483 株から得られた tigecycline 耐性株 (19483 TGC-2 株) は、tigecycline に対する感受性が 8 倍低下した (Table 9)。19483 TGC-2 株の *adeB* 発現量を測定したところ、親株である 19483 株と比較して 10.2 倍高いことが分かった (data not shown)。19483 TGC-2 株の ciprofloxacin および levofloxacin に対する感受性は親株と比べて 16 倍低下したが、DS-8587 では 8 倍の低下であった (Table 9)。

また、*A. baumannii* ATCC 19606 株から得られた norfloxacin 耐性株 (NFLX-16-2 株) は、norfloxacin に対する感受性が 8 倍低下した (Table 10)。NFLX-16-2 株の *abeM* 発現量を測定したところ、親株である ATCC 19606 株と比較して 3.4 倍高く、*gyrA* および *parC* の QRDR に変異は認められなかった。 (data not shown)。NFLX-16-2 株の ciprofloxacin に対する感受性は親株と比べて 4 倍低下したが、levofloxacin および DS-8587 では 2 倍の低下であった (Table 10)。NFLX-16-2 株から得られた *abeM* 欠損株 (#2-1-12 株) の norfloxacin および ciprofloxacin に対する感受性は、親株である NFLX-16-2 株と比較してそれぞれ 8 および 4 倍活性が向上したが、levofloxacin および DS-8587 では共に 2 倍の活性向上であった (Table 10)。

**Table 9. Antibacterial activity against the laboratory-generated strain of *adeA/adeB/adeC* overexpressing *A. baumannii*.**

Strain	MIC (mg/L)			
	Tigecycline	DS-8587	Ciprofloxacin	Levofloxacin
19483 (Parent Strain)	2	1	64	4
19483 TGC-2 (Overexpressing <i>adeABC</i> )	16 (8)*	8 (8)	1024 (16)	64 (16)

\*MIC ratios (19483 TGC-2/19483) are shown in parentheses.

基礎報文 1) の Table 4 を改変した。



**Table 10. Antibacterial activity against laboratory-generated strains of *abeM* overexpressing and deletion mutant of *A. baumannii*.**

Strain	MIC (mg/L)			
	Norfloxacin	DS-8587	Ciprofloxacin	Levofloxacin
ATCC 19606 (Parent strain)	8	0.12	1	0.5
NFLX-16-2* (Overexpressing <i>abeM</i> )	64	0.25	4	1
#2-1-12** (Deficient for <i>abeM</i> )	8 (8)***	0.12 (2)	1 (4)	0.5 (2)

\* Norfloxacin resistant strain derived from ATCC 19606. No amino acid change in the QRDRs of *gyrA* and *parC*.

\*\* Derivatives of NFLX-16-2 deleted for *abeM*.

\*\*\* MIC ratios (NFLX-16-2/#2-1-12) are shown in parentheses.

基礎報文 1) の Table 5 を改変した。

## 考察

MLST 解析により ST を同定した結果、ciprofloxacin 耐性株には ST-2 が多いことが明らかとなった (Table 6)。欧米や日本以外のアジアにおいて、多剤耐性株で ST-2 が多いことが報告されており (47-50)、医療現場で大きな問題となっている。ciprofloxacin 耐性あるいは多剤耐性株に ST-2 が多い理由は分からないが、これら要因を追究して原因を把握することが臨床現場で問題となっている ST-2 が広まるのを防ぐ方策に繋がる可能性があると考えられる。

ST-2 を含む全ての ciprofloxacin 耐性株で、GyrA 変異に加えて ParC あるいは ParE に変異が認められた (Table 6)。GyrA および ParC 変異については、過去の知見 (28, 29) と一致したが、ParE の 458 位に変異が認められたのは今回が初めてである。Ciprofloxacin 耐性 *E. coli* では ParE の 458 位 (*A. baumannii* ParE 458 位の相同位) に変異が見つかっている (51) ことから、この ParE 変異はキノロン耐性に寄与していることが推察された。

抗菌薬排出システムの遺伝子である *adeA*、*adeB*、および *adeC* と、その調節因子である *adeS* および *adeR* の 5 遺伝子全てを保有しているのは、ciprofloxacin 感受性株 (4.8%) と比較して ciprofloxacin 耐性株 (74.2%) では明らかに多かった (Table 6)。また、4 株の ciprofloxacin 耐性株で *adeS* に IS*AbaI* が挿入されていることが判明した。IS*AbaI* が *adeS* に挿入されることで、AdeABC の発現が亢進することが報告されているが (52, 53)、AdeABC により排出されることが知られている ciprofloxacin、levofloxacin、および tigecycline のこれら 4 株に対する MIC range は、第 1 章の結果 (Fig. 7) からそれぞれ >64、16-64、および 1-8 mg/L であった。この値は他の ciprofloxacin 耐性株に対する MIC と比べて大きいことから、これら 4 株についても AdeABC が高発現となっている可能性が示唆された。それら 4 株に対する DS-8587 の MIC range は 1-4 mg/L であり、ciprofloxacin、

levofloxacin を上回る高い活性を示した。

Ciprofloxacin 感受性株を用いた検討で、NMP 併用時に ciprofloxacin の抗菌活性が 4 倍以上低下したのは 5 株であったが、その中で *adeS/adeR/adeA/adeB/adeC* の 5 遺伝子全てを保有する株はいなかった (4 遺伝子: 1 株、1 遺伝子: 1 株、0 遺伝子: 3 株)。このことから、NMP は AdeABC 以外の抗菌薬排出システムを阻害すると考えられた。一方、ciprofloxacin 感受性株の中で NMP 併用時に DS-8587 の抗菌活性が 4 倍以上低下したのは 1 株であったことから、DS-8587 は NMP が阻害する AdeABC 以外の抗菌薬排出システムの影響を受けにくいことが示唆された。今後、NMP がどの抗菌薬排出システムを阻害するかを精査することが必要である。

今回の検討において *qnr* 遺伝子を保有する臨床分離株は見つからなかった。Touati らの報告 (54) では *A. baumannii* において当該遺伝子保有株が見つかったが、その他の報告 (55, 56) では見つかっておらず、*A. baumannii* では *qnr* 遺伝子保有株は稀であると考えられる。しかしながら、腸内細菌属では *qnr* がコードされたプラスミドの伝播が急速に進行しており、*A. baumannii* でも急速な伝播が起きる可能性があることから、今後の疫学動向に注意することが必要である。

次に、臨床分離株で多く認められた GyrA の 81 位および ParC の 84 位が変異した酵素に対する DS-8587 の阻害活性を測定した結果、その変異の影響を受ける程度が ciprofloxacin および levofloxacin より小さいことが判明した。(Table 8)。また、抗菌薬排出システムである *adeABC* 高発現株あるいは *abeM* 高発現および欠損株を用いてそれら排出システムの抗菌活性への影響を解析した結果、DS-8587 は ciprofloxacin と比べてそれらの影響を受けにくいことを見出した (Table 10, 11)。抗菌薬排出システムの影響については、さらなる確証を得るために各高発現株について目的とするタンパク質および AdeABC あるいは AbeM 以外の抗菌薬排出システムの発現量を解析する必要はあるが、ciprofloxacin の抗菌活性が変化する過去の知見 (24) と一致することから、DS-8587 はこれら臨床分離株で認められたキノロン耐性機序の影響を受けにくいことが示唆された。DS-8587 に対する耐性菌出現頻度は ciprofloxacin のそれよりも低かった (第 1 章) が、これは DS-8587 が変異型標的酵素に対して高い阻害活性を有し、抗菌薬排出システムの影響を受けにくいことに起因すると推察される。

本章の研究によって、キノロン耐性機序である標的酵素の変異および抗菌薬排出システムによる DS-8587 の抗菌活性の変化は、ciprofloxacin のそれと比べて小さいことが明らかとなった。



### 第3章 多剤耐性 *A. baumannii* を用いたマウス腓腹筋感染モデルにおける DS-8587 の抗菌効果

#### 諸言

第1章および第2章における結果から、DS-8587 は *in vitro* において ciprofloxacin 耐性および多剤耐性 *A. baumannii* に対して、キノロン耐性機序による活性変化が ciprofloxacin より小さく、既存抗菌薬を上回る高い抗菌活性を有することを見出した。臨床試験に進むためには、DS-8587 が *A. baumannii* に対して *in vivo* での抗菌効果を示すことが必要である。また、*in vivo* における Pharmacokinetics-pharmacodynamics (PK/PD) 解析を通して得られたターゲット値は、第2相試験実施のための用法・用量を設定する根拠となる。PK/PD 解析に用いられるモデルとしてマウス肺炎モデルおよびマウス筋肉内感染モデルがあり、既存抗菌薬ではこれらのモデルを用いた PK/PD 解析と臨床効果との相関が示されている (57-59)。新規抗菌薬についてもこれらの評価を実施し、臨床用法・用量の設定に利用可能なパラメーター値を算出することが重要である。*In vivo* 抗菌効果と相関する PK/PD パラメーターとして、 $C_{max}$  を MIC で除した値 ( $C_{max}/MIC$ )、AUC を MIC で除した値 (AUC/MIC)、および血中濃度が MIC 以上の濃度を維持する時間 (%T>MIC) がある。キノロン系抗菌薬は、その *in vivo* 抗菌効果が AUC/MIC と相関することがこれまでの研究成果から示されている (58, 59)。

本章では、多剤耐性 *A. baumannii* を用いたマウス腓腹筋感染モデルにおける DS-8587 の *in vivo* 抗菌効果を検証した。また、PK/PD 解析を実施することで、DS-8587 の *in vivo* 抗菌効果と相関するパラメーターを検証し、本化合物を臨床開発する上で用量設定の根拠となる static PK/PD パラメーターを算出した。

#### 材料方法

##### 1. 使用菌株

第1章に記載した臨床分離株を使用した。

##### 2. 使用培地

トリプトソイ寒天培地 (TSA ; 栄研化学株式会社) および第1章に記載した培地を用いた。

##### 3. 使用抗菌薬

第1章に記載した抗菌薬を使用した。

##### 4. 使用動物

4-5 週齢の Crlj:CD1 (ICR) 系雌性マウス (日本チャールス・リバー株式会社) を用いた。動物は温度  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 20\%$ 、および照明 12 時間/日 (8:00~20:00) の環境下で飼育し、自由

給餌および自由給水とした。動物の取り扱い第一三共株式会社の定める「実験動物に関する細則」に従って実施した。

## 5. マウス腓腹筋感染モデルにおける抗菌作用の検討

白血球減少処置として、シクロフォスファミド（エンドキサン、塩野義製薬株式会社）を感染 4 および 1 日前にそれぞれ 150 および 100 mg/kg の割合で腹腔内投与した。多剤耐性 *A. baumannii* 1593644 株を凍結保存ストックより TSA に塗抹し、35°C で一晚培養した。発育したコロニーを MHB に接種し、35°C で一晚静置培養した。培養後の菌液は MHB を用いて  $OD_{620}=0.03$  となるように調製し、それを接種菌液とした。塩酸ケタミン（第一三共プロファーマ株式会社）、塩酸キシラジン（バイエル株式会社）、および注射用水 2:1:4 の混合液をマウスあたり 0.07 ml の割合で筋肉内投与し、麻酔状態となったマウスの右腓腹筋に接種菌液を 0.04 ml ずつ接種した ( $n=3$ )。DS-8587 は、注射用水を用いて溶解した。総投与量は 32、64、128、および 256 mg/kg/day とし、感染 2 時間後から投薬を開始してマウス 10 g あたり 0.1 ml を皮下投与した。投与回数は用法に応じて、2 回投与では 12 時間間隔、4 回投与では 6 時間間隔、8 回投与では 3 時間間隔で投与した。

## 6. 腓腹筋内生菌数測定

Pre-control は投薬開始時（感染 2 時間後）に、post-control および DS-8587 投与群は投薬開始 24 時間後（感染 26 時間後）に放血殺した後、腓腹筋を採材した。採材した腓腹筋は 3 ml のリン酸緩衝生理食塩液を加えオートホモジナイザーでホモジネート液を作製した。このホモジネート液を自動生菌数測定装置 DD-700（大日本精機）を用いて希釈し、TSA に塗布後、35°C で一晚培養した。生育したコロニーを目視でカウントして腓腹筋内の生菌数（CFU/ml）を算出した。

## 7. PK/PD 解析

### a) 採血

0.25、2、16、128、および 256 mg/kg を単回投与し、投薬 0.25、0.5、1、2、3、4、および 6 時間後に麻酔下で腹大動脈から採血し、血清分離剤入り真空採血管ニプロネオチューブ PET（ニプロ株式会社）に採取した。血液は室温で 15~30 分間放置後、遠心分離（1,800×g、10 分間、4°C）により血清を分離した。

### b) 血中濃度測定

島津 20A（島津製作所）を備えた API4000（AB Sciex）を用いて液体クロマトグラフ／タンデム質量分析装置（LC-MS-MS）で濃度を測定した。Atlantis dC18 カラム（5  $\mu$ M pore size, 2.1×150 mm; 日本ウォーターズ株式会社）を使い、移動相には 10 mM ammonium formate buffer (pH 3.0)/アセトニトリルを用いた。AUC<sub>0-6h</sub> は台形法により算出し、各用量の最も高い濃度を  $C_{max}$  とした。実測値を使った投与量と AUC<sub>0-6h</sub> あるいは  $C_{max}$  の相関を一次直線式で求め、実測値以外の用量における AUC<sub>0-6h</sub> および  $C_{max}$  を推定した。



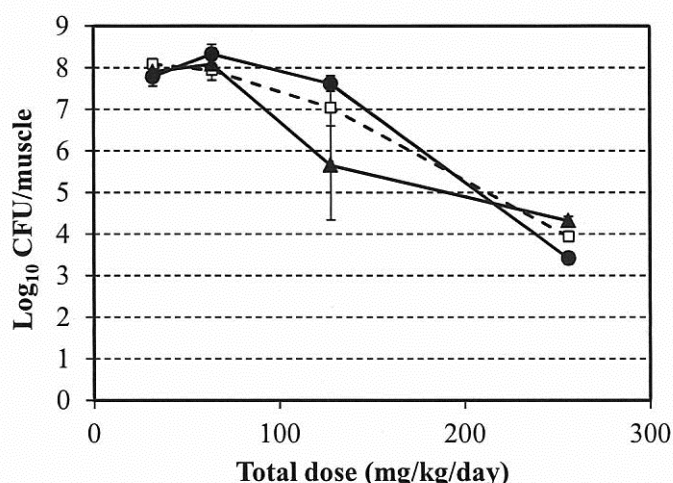
### c) PK/PD パラメーター解析

投薬開始 24 時間後（感染 26 時間後）の腓腹筋内生菌数と最も相関する PK/PD パラメーターを解析するため、AUC/MIC、 $C_{\max}$ /MIC、あるいは %T>MIC と腓腹筋内生菌数の相関をシグモイド  $E_{\max}$  モデル（Graphpad Prism 4, GraphPad Software, Inc., USA）で算出した。

## 結果

### 1. DS-8587 のマウス腓腹筋感染モデルにおける *in vivo* 抗菌効果

多剤耐性 *A. baumannii* 1593644 株を用い、マウス腓腹筋感染モデルにおける DS-8587 の *in vivo* 抗菌効果を評価した。非投薬群の腓腹筋内生菌数は、 $5.69 \log_{10}$  CFU/muscle から 24 時間後には  $8.38 \log_{10}$  CFU/muscle に増加した。DS-8587 を計 256 mg/kg となるように 2 分割（12 時間毎）、4 分割（6 時間毎）、あるいは 8 分割（3 時間毎）投与した群の投薬後の腓腹筋内生菌数は、それぞれ 4.32、3.94、あるいは  $3.42 \log_{10}$  CFU/muscle であり、投薬開始時の菌数を下回った（Fig. 10）。一方、計 128 mg/kg となるように 2 分割した群の投薬後菌数は  $5.66 \log_{10}$  CFU/muscle であったが、4 分割あるいは 8 分割投与した群の



**Fig. 10. Relationship between the DS-8587 dose level and its *in vivo* efficacy in a murine calf muscle infection model with MDR *A. baumannii* 1593644.**

Closed triangle: twice daily (q12h); open square: four times daily (q6h); closed circle: eight times daily (q3h). Each symbol represents the mean  $\pm$  SEM (n=3).

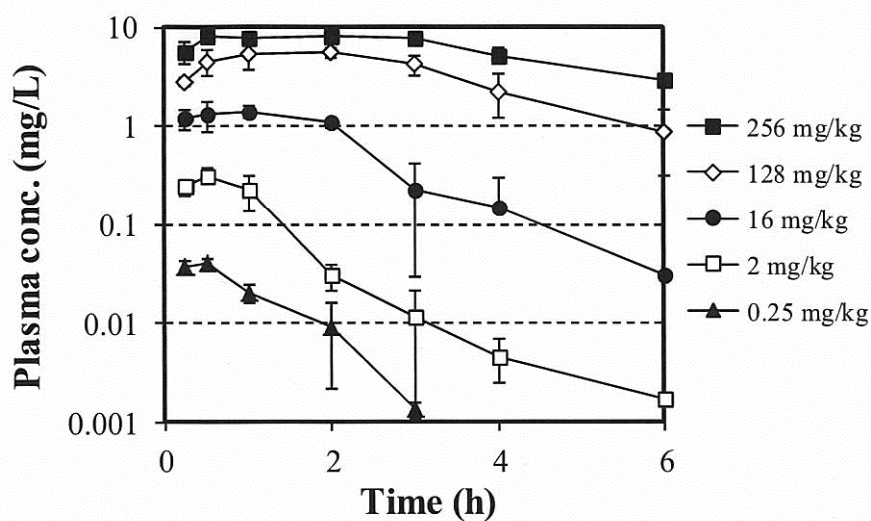
基礎報文 3) の Figure 2

菌数は非投薬群と比べて菌数減少は  $2 \log_{10}$  CFU/muscle 未満であることが分かった。以上の結果から、DS-8587 を総量 256 mg/kg 投与することで、多剤耐性 *A. baumannii* を用いたマウス腓腹筋感染モデルで *in vivo* 抗菌効果が認められた。また、分割投与による抗菌効果の増強あるいは減弱は認められなかった。

### 2. マウス腓腹筋感染モデルにおける PK/PD 解析

DS-8587 をマウスに単回投与して血中濃度を測定した結果を Fig. 11 および Table 12 に示した。多剤耐性 *A. baumannii* 1593644 株を用いた DS-8587 のマウス腓腹筋感染モデルにおける *in vivo* の抗菌効果と、AUC/MIC、 $C_{\max}$ /MIC、および %T>MIC との相関を解析した結果、DS-8587 の *in vivo* 抗菌効果は AUC/MIC と相関することが分かった（Fig. 12）。また、当該感染モデルにおいて投薬

開始時から投薬後まで菌数を増加させないための AUC/MIC (static AUC/MIC) を算出したところ、29.4 であることを見出した。



**Fig. 11.** The plasma concentrations of DS-8587 after administration of single doses of 0.25, 2, 16, 128, and 256 mg/kg of body weight in mice. Each symbol represents the mean  $\pm$  SD (n=3).

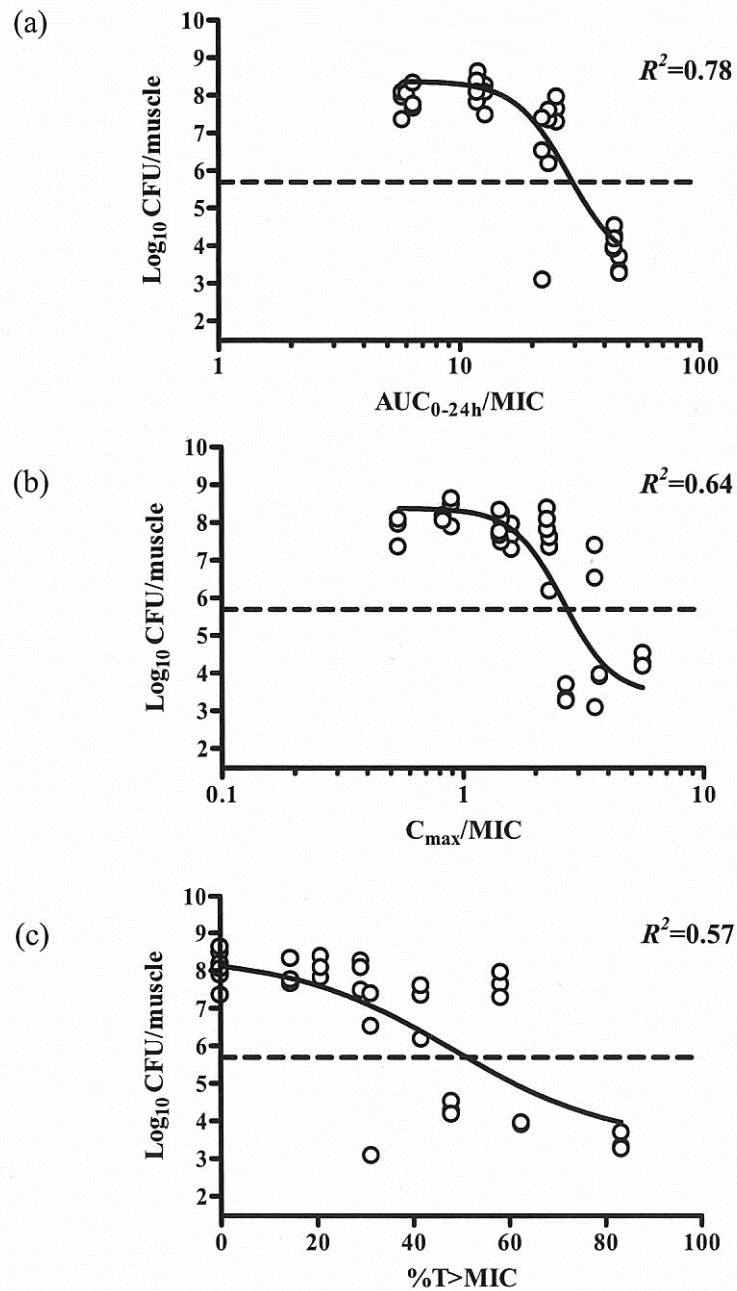
基礎報文 3) の Figure 3

**Table 12.** Pharmacokinetic parameters obtained from serum concentrations after administration of DS-8587.

Dose (mg/kg/day)	C <sub>max</sub> ( $\mu$ g/ml)	AUC <sub>0-6h</sub> ( $\mu$ g·h/ml)	T <sub>N/2</sub> (h)	T <sub>max</sub> (h)
0.25	0.04	0.05	0.5	0.5
2	0.32	0.40	1.0	0.5
16	1.43	3.44	1.0	1.0
128	5.58	20.68	1.4	2.0
256	8.37	37.45	2.1	2.0

基礎報文 3) の Table 2





**Fig. 12. The therapeutic efficacy of DS-8587 in multidrug resistant *A. baumannii* 1593644 calf muscle infection model.**

The correlations between the therapeutic efficacy of DS-8587 in calf muscle infection due to *A. baumannii* 1593644 in neutropenic mice and the  $\text{AUC}_{0-24\text{h}}/\text{MIC}$  (a), the  $C_{\text{max}}/\text{MIC}$  (b), or the  $\%T>\text{MIC}$  (c). Each symbol represents the bacterial number per mouse. The horizontal dashed lines represent the mean bacterial number at the onset of therapy.

## 考察

多剤耐性 *A. baumannii* を用いたマウス腓腹筋感染モデルにおいて、DS-8587 は総投与量 256 mg/kg で腓腹筋内菌数の減少が認められた。また、分割投与による抗菌作用の増強あるいは減弱は認められなかった。このことから、 $\%T > MIC$  あるいは  $C_{max}$  が DS-8587 投与時の腓腹筋内菌数に相関する可能性は低いと考えられた。一方、PK/PD パラメーターの解析結果から、DS-8587 の *in vivo* 抗菌効果は AUC/MIC に相関することが示された。過去の知見 (58, 59) から、キノロン系抗菌薬の *in vivo* 抗菌効果は AUC/MIC に相関することが示されており、今回の結果はそれと一致するものである。

治療開始時から治療後まで菌数を増加させないために必要な AUC/MIC は 29.4 であり、この値は既報のキノロン系抗菌薬での値 (58) とほぼ同じであった。*In vivo* 抗菌効果には血中タンパクと結合していないフリー体が寄与するという報告 (59) もあることから、DS-8587 のマウスタンパク結合率 (52%) (60) を考慮にいと、マウス腓腹筋感染モデルで *in vivo* 抗菌効果が認められるためには free drug AUC/MIC として 14.1 が必要である。一方、ヒトにおけるタンパク結合率は 57% (60) であることから、ヒトでは total AUC/MIC として 32.8 を達成するような用法および用量を第 1 相試験で確認することが必要である。

本研究では、PK/PD 解析から第 2 相試験実施のための用法・用量を設定する根拠となるデータを取得するために、マウス腓腹筋感染モデルを用いて DS-8587 の *in vivo* 抗菌効果を評価した。一方、*A. baumannii* は肺炎を引き起こすことが知られており、頻度は低い尿路感染症の起因菌となることも知られている (61)。このことから、今後は DS-8587 の組織および尿中移行性の解析や *A. baumannii* によるマウス肺炎モデルあるいは尿路感染症モデルでの抗菌作用を検討することが必要である。

本章の結果から、DS-8587 は多剤耐性 *A. baumannii* に対して *in vivo* 抗菌効果を示すことが明らかとなった。また、DS-8587 の *in vivo* 抗菌効果に相関する PK/PD パラメーターは AUC/MIC であり、static AUC/MIC は 29.4 であることが分かった。



## 総括

本研究では、新規キノロン系抗菌薬 DS-8587 の *A. baumannii* 感染症に対する治療薬としての素質を見極めるべく、*in vitro* 抗菌活性および *in vivo* 抗菌効果を検証した。第1章では DS-8587 が ciprofloxacin 耐性および多剤耐性 *A. baumannii* に対して既存抗菌薬を上回る高い抗菌活性を示すこと、短時間殺菌力を有すること、および耐性菌出現頻度が低いことを示した。第2章では、第1章での解析結果から判明した DS-8587 の ciprofloxacin 耐性 *A. baumannii* に対する高い抗菌活性は、ciprofloxacin と比較して DS-8587 がキノロン耐性機序の影響を受けにくいことを示した。第3章では、DS-8587 が多剤耐性 *A. baumannii* に対して *in vivo* 抗菌効果を示し、その効果は AUC に関連することを示した。

本研究により特長づけられた DS-8587 の優れた点は次の3つである。1つ目は、ciprofloxacin 耐性 *A. baumannii* にも高い活性を示すことである。標的酵素に変異を有する株に対しても高い活性を示すことは、ciprofloxacin や levofloxacin では治療できない *A. baumannii* に対して DS-8587 が新たな治療薬となる可能性を示唆する結果である。今回の検討あるいは既報の結果から、GyrA あるいは ParC のそれぞれに2重変異を有する臨床分離 *A. baumannii* はこれまでのところ認められていない。しかし、*S. aureus*、*S. pneumoniae*、および *E. coli* ではそのような2重変異株が確認されており (62-64)、*A. baumannii* でもそのような株が出現するとそれらに対する DS-8587 の抗菌活性は低いことが予想される。DS-8587 が上市された際には、PK/PD パラメーターを踏まえた適切な投与方法を守って使用し、そのような株を出現させないようにする必要がある。

2つ目は ciprofloxacin よりも耐性菌出現頻度が低いことである。これは、DS-8587 が標的酵素変異体が出現してもそれらに対して高い酵素阻害活性を有すること、抗菌薬排出システムの発現が亢進してもその影響を受けにくいこと、また、短時間殺菌力が認められることに起因すると推察される。一方、*A. baumannii* はバイオフィルムを形成することが知られているが (65, 66)、*P. aeruginosa* ではバイオフィルムを形成すると ciprofloxacin に対する耐性菌が出現する頻度が高くなることが示されており (67)、*A. baumannii* でも *P. aeruginosa* と同様にバイオフィルムを形成することが耐性菌を生み出す原因になると考えられる。今後、DS-8587 のバイオフィルムに対する活性を測定して特長を把握し、DS-8587 に対する耐性菌を生み出すリスクを低下させる方策を考えることが必要である。

3つ目は PK/PD 解析の結果から、AUC/MIC が 29.4 で *in vivo* における抗菌効果を示した点である。このことから、DS-8587 の MIC が 0.5-2 mg/L の多剤耐性 *A. baumannii* (Table 2) に対して、第2相試験を実施するにあたり求められる AUC (タンパク結合率を考慮にいたした 17~66  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ) がヒトで達成可能かどうかを第1相試験で見極めることになる。DS-8587 と同じくキノロン系抗菌薬である levofloxacin をヒトに 500 mg 単回投与した際の AUC は 47.8  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  (68)、moxifloxacin をヒトに 400 mg 投与した際の AUC は 51.9  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  (69) であることから、安全性が担保されれば DS-8587 でも AUC が 17-66  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  となるようにヒトに投与することが可能であると推察される。

本研究で示された DS-8587 の *A. baumannii* に対する優れた活性は、本薬の臨床試験推進を支持するものである。今後、本薬が臨床試験を経て上市され、*A. baumannii* による感染症に苦しむ患者

を救うことが期待される。



## 謝辞

本研究を推進するにあたり、御指導ならびに御鞭撻を賜りました京都薬科大学 微生物・感染制御学分野 後藤 直正 教授に衷心より謝意を表します。

本論文の査読ならびに御指導を賜りました京都薬科大学 細胞生物学分野 藤室 雅弘 教授、同生化学分野 中山 祐治 教授に篤く御礼申し上げます。

本研究に関して貴重な御助言を賜りました京都薬科大学 微生物・感染制御学分野 皆川 周助教ならびに同分野 林 直樹 助教に心より御礼申し上げます。

本研究の実施および発表の機会を与えていただき、終始御激励および御助言を賜りました第一三共株式会社 生物医学研究所所長 芝野 俊郎 博士（現研究統括部 参事）、同社生物医学研究所所長 熊倉 誠一郎 博士、同研究所グループ長 星野 一樹 博士（現ワクチン事業部 グループ長）、同社癌研究所所長 青沼 正志 博士に深謝いたします。

本研究の推進にあたり御指導および御助言いただき、また、本研究の遂行に多大な御協力をいただきました次の方々に心より感謝申し上げます。

第一三共株式会社 創薬化学研究所 高橋 寿 グループ長、同研究所 小森谷 聡 主任研究員、同研究所 吉田 賢一 副主任研究員、同社バイオ基盤研究所 小野寺 宜郷 主任研究員、同社生物医学研究所 奥村 亮 主任研究員、同研究所 難波 栄子 研究員、同社ワクチン事業部 黒坂 勇一 主任研究員、同事業部 藤川 香津子 主任研究員、同事業部 吉田 久美 副主任研究員、同事業部 魚山 里織 専門研究員、同事業部 千葉 めぐみ 研究員、同事業部 苅部 幸江 研究員、同事業部 田辺 美穂 研究員、同社バイオ創薬研究所 石井 千晶 専門研究員、同社癌研究所 安東 治 グループ長（現 U3 Pharma GmbH 主席）、同研究所 富永 裕一 グループ長、同研究所 鎌井 泰樹 主任研究員、同社薬物動態研究所 萩原 克宣 副主任研究員、第一三共 RD ノバーレ株式会社 生物評価研究部 大谷 剛 主任研究員、京都薬科大学 微生物・感染制御学分野 D2 四方 基嗣 氏

本研究に際し、様々な御支援をいただきました友人の皆様ならびに家族に感謝いたします。

## 参考文献

1. **Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H.** 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**:939-951.
2. **Bergogne-Berezin E, Towner KJ.** 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**:148-165.
3. **Camp C, Tatum OL.** 2010. A Review of *Acinetobacter baumannii* as a Highly Successful Pathogen in Times of War. *Laboratory Medicine.* **41**:649-657.
4. **Jones RN.** 2010. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **51**:S81-87.
5. **Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S.** 2010. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS one.* **5**:e10034.
6. **Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A.** 2013. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **41**:11-19.
7. **Sader HS, Flamm RK, Jones RN.** 2013. Tigecycline activity tested against antimicrobial resistant surveillance subsets of clinical bacteria collected worldwide (2011). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **76**:217-221.
8. **Mayne D, Dowzicky MJ.** 2012. In vitro activity of tigecycline and comparators against organisms associated with intra-abdominal infections collected as part of TEST (2004-2009). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **74**:151-157.
9. **Morfin-Otero R, Dowzicky MJ.** 2012. Changes in MIC within a global collection of *Acinetobacter baumannii* collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial, 2004 to 2009. *Clin. Ther.* **34**:101-112.
10. **Mera RM, Miller LA, Amrine-Madsen H, Sahm DF.** 2010. *Acinetobacter baumannii* 2002-2008: increase of carbapenem-associated multiclass resistance in the United States. *Microb. Drug Resist.* **16**:209-215.
11. **Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P.** 2010. Coexistence of *bla*<sub>OXA-23</sub> with *bla*<sub>NDM-1</sub> and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**:2253-2254..
12. **Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N.** 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect. Dis.* **10**:597-602.
13. **Park YS, Lee H, Lee KS, Hwang SS, Cho YK, Kim HY, Uh Y, Chin BS, Han SH, Jeong SH, Lee K, Kim JM.** 2010. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors for



- acquisition and prevalent OXA-type carbapenemases-a multicentre study. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **36**:430-435.
14. **Arroyo LA, Herrera CM, Fernandez L, Hankins JV, Trent MS, Hancock RE.** 2011. The *pmrCAB* operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:3743-3751.
  15. **Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N.** 2012. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**:1607-1615.
  16. **Chen YH, Lu PL, Huang CH, Liao CH, Lu CT, Chuang YC, Tsao SM, Chen YS, Liu YC, Chen WY, Jang TN, Lin HC, Chen CM, Shi ZY, Pan SC, Yang JL, Kung HC, Liu CE, Cheng YJ, Liu JW, Sun W, Wang LS, Ko WC, Yu KW, Chiang PC, Lee MH, Lee CM, Hsu GJ, Hsueh PR.** 2012. Trends in the susceptibility of clinically important resistant bacteria to tigecycline: results from the Tigecycline In Vitro Surveillance in Taiwan study, 2006 to 2010. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**:1452-1457.
  17. **Park YK, Choi JY, Shin D, Ko KS.** 2011. Correlation between overexpression and amino acid substitution of the *PmrAB* locus and colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **37**:525-530.
  18. **Bou G, Martinez-Beltran J.** 2000. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:428-432.
  19. **Gootz TD, Marra A.** 2008. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant threat. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **6**:309-325.
  20. **Gordon NC, Wareham DW.** 2010. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **35**:219-226.
  21. **Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picao RC, Gales AC.** 2010. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **8**:71-93.
  22. **Piddock LJ.** 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**:382-402.
  23. **Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zorawski M, Krawczyk M, Tryniszewska E.** 2008. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*-the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia Histochem. Cytobiol.* **46**:257-267.
  24. **Coyne S, Courvalin P, Perichon B.** 2011. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:947-953.
  25. **Schoeffler AJ, Berger JM.** 2005. Recent advances in understanding structure-function relationships in the type II topoisomerase mechanism. *Biochem. Soc. Trans.* **33**:1465-1470.
  26. **Drlica K, Hiasa H, Kerns R, Malik M, Mustaev A, Zhao X.** 2009. Quinolones: action and

- resistance updated. *Curr. Top. Med. Chem.* **9**:981-998.
27. **Silva-Sanchez J, Cruz-Trujillo E, Barrios H, Reyna-Flores F, Sanchez-Perez A, Garza-Ramos U.** 2013. Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* pediatric clinical isolates in Mexico. *PLoS one* **8**:e77968.
  28. **David C. Hooper, Ethan Rubinstein.** 2003. Mechanisms of quinolone resistance. *Quinolone Antimicrobial Agents*, 3rd Edition. American Society of Microbiology Press, Washington, DC. pp. 41-68.
  29. **Higgins PG, Stubbings W, Wisplinghoff H, Seifert H.** 2010. Activity of the investigational fluoroquinolone finafloxacin against ciprofloxacin-sensitive and -resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:1613-1615.
  30. **Wohlkonig A, Chan PF, Fosberry AP, Homes P, Huang J, Kranz M, Leydon VR, Miles TJ, Pearson ND, Perera RL, Shillings AJ, Gwynn MN, Bax BD.** 2010. Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**:1152-1153.
  31. **Chiba M, Fujikawa K, Okumura R, Kurosaka Y, Hoshino K.** DS-8587, a new generation of broad spectrum qinolone: Antibacterial spectrum and its in vitro activities against clinical isolates in Japan. In: Abstracts of the 52nd Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. San Francisco, 2012. Abstr. F-2037. Washington, DC: American Society for Microbiology.
  32. **Yamaguchi K, Ohno A, Ishii Y, Tateda K, Iwata M.** 2012. *In vitro* susceptibilities to levofloxacin and various antibacterial agents of 12,866 clinical isolates obtained from 72 centers in 2010. *Jpn. J. Antibiot.* **65**:181-206.
  33. **Yamaguchi K, Ohno A, Ishii Y, Tateda K, Iwata M, Kanda M, Akizawa K, Shimizu C, Kon S, Nakamura K, Matsuda K, Tominaga M, Nakagawa T, Sugita A, Ito T, Kato J, Suwabe A, Yamahata K, Kawamura C, Tashiro H, Horiuchi H, Katayama Y, Kondou S, Misawa S, Murata M, Kobayashi Y, Okamoto H, Yamazaki K, Okada M, Haruki K, Kanno H, Aihara M, Maesaki S, Hashikita G, Miyajima E, Sumitomo M, Saito T, Yamane N, Kawashima C, Akiyama T, Ieiri T, Yamamoto Y, Okamoto Y, Okabe H, Moro K, Shigeta M, Yoshida H, Yamashita M, Hida Y, Takubo T, Kusakabe T, Masaki H, Heijyou H, Nakaya H, Kawahara K, Sano R, Matsuo S, Kono H, Yuzuki Y, Ikeda N, Idomuki M, Soma M, Yamamoto G, Kinoshita S, Kawano S, Oka M, Kusano N, Kang D, Ono J, Yasujima M, Miki M, Hayashi M, Okubo S, Toyoshima S, Kaku M, Sekine I, Shiotani J, Tazawa Y, Yoneyama A, Kumasaka K, Koike K, Taniguchi N, Ozaki Y, Uchida T, Murakami M, Inuzuka K, Gonda H, Yamaguchi I, fujimoto Y, Iriyama J, Asano Y, Genma H, Maekawa M, Yoshimura H, Nakatani K, Baba H, Ichiyama S, Fujita S, Kuwabara M, Okazaki T, Fujiwara H, Ota H, Nagai A, Fujita J, Negayama K, Sugiura T, Kamioka M, Murase M, Nakasone I, Okayama A, Aoki Y, Kusaba K, Nakashima Y, Miyanohara H, Hiramatsu K, Saikawa T, Yanagihara K, Matsuda J, Kohno S, Mashiba K.** 2009. *In vitro* susceptibilities to levofloxacin and various antibacterial agents of



- 12,919 clinical isolates obtained from 72 centers in 2007. *Jpn. J. Antibiot.* **62**:346-370.
34. **Queenan AM, Pillar CM, Deane J, Sahm DF, Lynch AS, Flamm RK, Peterson J, Davies TA.** 2012. Multidrug resistance among *Acinetobacter* spp. in the USA and activity profile of key agents: results from CAPITAL Surveillance 2010. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **73**:267-270.
  35. **Wang YF, Dowzicky MJ.** 2010. *In vitro* activity of tigecycline and comparators on *Acinetobacter* spp. isolates collected from patients with bacteremia and MIC change during the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial, 2004 to 2008. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **68**:73-79.
  36. **Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL.** 2006. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*<sub>OXA-51-like</sub> carbapenemase gene intrinsic to this species. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2974-2976.
  37. **Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tang CT, Chang TC.** 2005. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *J. Clin. Microbiol.* **43**:1632-1639.
  38. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard -ninth edition. M07-A9. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012.
  39. **Okumura R, Onodera Y, Chiba M, Fujikawa K, Hoshino K.** DS-8587, a new generation of broad spectrum quinolone: Mode of action and frequency of resistant mutants of major pathogens. In: Abstracts of the 52nd Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. San Francisco, 2012. Abstr. F-2038. Washington, DC: American Society for Microbiology.
  40. **Kouyama Y, Harada S, Ishii Y, Saga T, Yoshizumi A, Tateda K, Yamaguchi K.** 2012. Molecular characterization of carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter* spp. in Japan: predominance of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 92 and IMP-type metallo-beta-lactamase-producing non-baumannii *Acinetobacter* species. *J. Infect. Chemother.* **18**:522-528.
  41. **Piddock LJ.** 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998. *Drugs* **58 Suppl 2**:11-18.
  42. **Guan X, Xue X, Liu Y, Wang J, Wang Y, Wang K, Jiang H, Zhang L, Yang B, Wang N, Pan L.** 2013. Plasmid-mediated quinolone resistance-current knowledge and future perspectives. *J. Int. Med. Res.* **41**:20-30.
  43. **Coban AY, Guney AK, Tanriverdi Cayci Y, Durupinar B.** 2011. Effect of 1-(1-Naphthylmethyl)-piperazine, an efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibilities of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *Curr. Microbiol.* **62**:508-511.
  44. **Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P.** 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**:394-397.
  45. **Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, Blais J, Cho D, Chamberland S, Renau T, Leger R, Hecker S, Watkins W, Hoshino K, Ishida H, Lee VJ.** 2001.

- Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:105-116.
46. **Simon R, Priefer U, Plihl A.** 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology.* **1**:784-794.
  47. **He C, Xie Y, Fan H, Kang M, Tao C, Zhang R, Hu Y, Chen Z, Wang L.** 2011. Spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* of European clone II in Western China. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **38**:257-260.
  48. **Minandri F, D'Arezzo S, Antunes LC, Pourcel C, Principe L, Petrosillo N, Visca P.** 2012. Evidence of diversity among epidemiologically related carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* strains belonging to international clonal lineage II. *J. Clin. Microbiol.* **50**:590-597.
  49. **Espinal P, Macia MD, Roca I, Gato E, Ruiz E, Fernandez-Cuenca F, Oliver A, Rodriguez-Bano J, Bou G, Tomas M, Vila J.** 2013. First report of an OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate related to Tn2006 in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**:589-591.
  50. **Saule M, Samuelsen O, Dumpis U, Sundsfjord A, Karlson A, Balode A, Miklasevics E, Karah N.** 2013. Dissemination of a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to international clone II/sequence type 2 and harboring a novel AbaR4-like resistance island in Latvia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**:1069-1072.
  51. **Uchida Y, Mochimaru T, Morokuma Y, Kiyosuke M, Fujise M, Eto F, Harada Y, Kadowaki M, Shimono N, Kang D.** 2010. Geographic distribution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* strains in Asia. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **35**:387-391.
  52. **Ruzin A, Keeney D, Bradford PA.** 2007. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**:1001-1004.
  53. **Sun JR, Perng CL, Chan MC, Morita Y, Lin JC, Su CM, Wang WY, Chang TY, Chiueh TS.** 2012. A Truncated AdeS Kinase Protein Generated by IS*AbaI* Insertion Correlates with Tigecycline Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS one.* **7**:e49534.
  54. **Touati A, Brasme L, Benallaoua S, Gharout A, Madoux J, De Champs C.** 2008. First report of *qnrB*-producing *Enterobacter cloacae* and *qnrA*-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **60**:287-290.
  55. **Yin XL, Hou TW, Xu SB, Ma CQ, Yao ZY, Li W, Wei L.** 2008. Detection of drug resistance-associated genes of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microb. Drug Resist.* **14**:145-150.
  56. **Adams-Haduch JM, Paterson DL, Sidjabat HE, Pasculle AW, Potoski BA, Muto CA, Harrison LH, Doi Y.** 2008. Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:3837-3843.



57. **Craig WA.** 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin. Infect. Dis.* **26**:1-12.
58. **Andes D, Craig WA.** 2002. Pharmacodynamics of the New Fluoroquinolone Gatifloxacin in Murine Thigh and Lung Infection Models. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1665-1670.
59. **Andes D, Craig WA.** 2003. Pharmacodynamics of the New Des-F(6)-Quinolone Garenoxacin in a Murine Thigh Infection Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3935-3941.
60. **Kobayashi N, Shimizu T, Toyama K, Kamiyama E, Suzuki E, Abiko T.** DS-8587, a new generation of broad spectrum quinolone: Non-clinical and clinical pharmacokinetic profiles. In: Abstracts of the 52nd Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. San Francisco, 2012. Abstr. F-2041. Washington, DC: American Society for Microbiology.
61. **Peleg AY, Seifert H, Paterson DL.** 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**:538-582.
62. **Horii T, Suzuki Y, Monji A, Morita M, Muramatsu H, Kondo Y, Doi M, Takeshita A, Kanno T, Maekawa M.** 2003. Detection of mutations in quinolone resistance-determining regions in levofloxacin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: effects of the mutations on fluoroquinolone MICs. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **46**:139-145.
63. **Richter SS, Heilmann KP, Beekmann SE, Miller NJ, Rice CL, Doern GV.** 2005. The molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* with quinolone resistance mutations. *Clin. Infect. Dis.* **40**:225-235.
64. **Aoike N, Saga T, Sakata R, Yoshizumi A, Kimura S, Iwata M, Yoshizawa S, Sugasawa Y, Ishii Y, Yamaguchi K, Tateda K.** 2013. Molecular characterization of extraintestinal *Escherichia coli* isolates in Japan: relationship between sequence types and mutation patterns of quinolone resistance-determining regions analyzed by pyrosequencing. *J. Clin. Microbiol.* **51**:1692-1698.
65. **Rotimi VO, Jamal W, Salama M.** 2009. Control of *Acinetobacter* outbreaks in the intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* **73**:286-287.
66. **Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, Cho DT.** 2008. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**:49-54.
67. **Driffield K, Miller K, Bostock JM, O'Neill AJ, Chopra I.** 2008. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**:1053-1056.
68. **Wagenlehner FM, Kinzig-Schippers M, Tischmeyer U, Wagenlehner C, Sorgel F, Dalhoff A, Naber KG.** 2006. Pharmacokinetics of ciprofloxacin XR (1000 mg) versus levofloxacin (500 mg) in plasma and urine of male and female healthy volunteers receiving a single oral dose. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **27**:7-14.
69. **Kanjanawart S, Gaysonsiri D, Phunikom K, Simasathiansopon S, Tangsucharit P, Vannaprasaht S, Kaewkamson T, Tassaneeyakul W.** 2013. Comparative bioavailability of two moxifloxacin tablet products after single dose administration under fasting conditions in a balanced, randomized and cross-over study in healthy volunteers. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*

51:249-254.